

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELI LIMBERGER GALVAN

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO E
GASOLINA: INTEGRANDO RELEVANTES ORGANISMOS E BIOMARCADORES**

CURITIBA

2015

GABRIELI LIMBERGER GALVAN

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO E
GASOLINA: INTEGRANDO RELEVANTES ORGANISMOS E BIOMARCADORES

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor no Programa de
Pós-Graduação em Ecologia e Conservação,
Setor de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete
Cestari

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Itsuo Yamamoto

CURITIBA

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



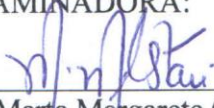
PARECER

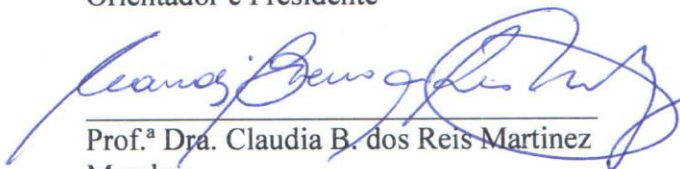
Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da tese, a que se submeteu **Gabrieli Limberger Galvan** para fins de adquirir o título de Doutora em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.


Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.


Curitiba, 27 de abril de 2015.


BANCA EXAMINADORA:

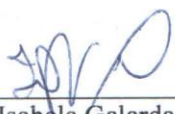

Prof.ª Dra. Marta Margarete Cestari
Orientador e Presidente


Prof.ª Dra. Claudia B. dos Reis Martinez
Membro


Prof.ª Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf
Membro


Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia
Membro


Prof. Dr. Luís Fernando Fávaro
Membro

Visto: 
Prof.ª Dra. Isabela Galarda Varassin
Coordenadora do PPG-ECO



AGRADECIMENTOS

À profa Dra. Marta Margarete Cestari e ao prof. Dr.Carlos Itsuo Yamamoto pela orientação e co-orientação.

Aos professores membros da banca examinadora Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez; Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf, Dr. Cesar Koppe Grisolia, Dr. Luís Fernando Fávaro e Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro pelas contribuições.

À equipe técnica do departamento de biologia celular Dra. Inês Rabitto; Israel Henrique Bini, Alessandra Santos e ao Prof. Dr. Edvaldo S. Trindade por todo o auxílio no scanner de lâminas para análise do ensaio cometa.

À todos os membros do laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, especialmente à Profa. Dra. Daniela M. Leme; Juliana L. Roratto; Karoline Felisbino; Natália C. Cambui; Jéssica N. Loyola pela participação direta no trabalho, contribuindo para a realização dos experimentos e análises.

Aos amigos muito especiais Taynah Vicari; Laercio D. S. Piancini; Geonildo R. Disner; Laís Oya Silva, Gustavo S. Santos; Flavio H. T. Osório; Tatiane Klingelfus; Ana Carolina Dagostim e Antonio H. Marques.

À Msc. Franciele Lima Bettim pelo compartilhamento do projeto que foi essencial para a realização do mesmo.

À minha família e ao namorado Yuri Sazanoff pelo apoio e compreensão.

À CAPES pela bolsa de estudos.



“All substances are poisons, there is none which is not a poison. The right dose differentiates a poison and a remedy”, Paracelsus¹.

¹ Xilogravura de Paracelsus, pseudônimo de Aureolus Philippus Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493-1541), considerado o pai da Toxicologia (Jorgensen, 2010).

RESUMO

O petróleo e seus derivados são misturas complexas contendo uma ampla variedade de hidrocarbonetos tóxicos. O modo de ação, o comportamento ambiental e os efeitos nos organismos causados por esses contaminantes ambientais envolvem diversas variáveis, como suas características físico-químicas, propriedades de seus componentes individuais, assim como as interações entre eles, com o ambiente e com os organismos. Na tentativa de integrar algumas dessas variáveis, foram avaliados os efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo (FSP) e da gasolina (FSG) em diferentes organismos, testes e biomarcadores, que foram associados às análises químicas. Os efeitos tóxicos das frações solúveis foram avaliados nos peixes Neotropicais *Astyanax altiparanae* e *Astyanax serratus* e também no peixe exótico padronizado *Danio rerio*. Foram realizados testes de letalidade aguda para estimar a concentração letal mediana (CL₅₀) e ensaios subletais, para avaliação de biomarcadores genéticos, celulares, hematológicos e somáticos. Os ensaios subletais em peixes foram realizados com períodos de exposição e depuração. Testes de toxicidade também foram realizados com a bactéria *Vibrio fischeri*, para a determinação da concentração de efeito tóxico mediano (CE₅₀) e com o sistema vegetal *Allium cepa*, para a avaliação do potencial cito-genotóxico e mutagênico dos compostos. Em geral, a FSG apresentou maior concentração de hidrocarbonetos aromáticos solubilizados e foi mais tóxica que a FSP. A CL₅₀ da FSG variou de 15 a 20%, dependendo da espécie, já a FSP não causou letalidade. Ambos os contaminantes causaram aumento de quebras no DNA em diferentes tecidos dos peixes, indução de anomalias nucleares, alterações da frequência de eritrócitos imaturos e dos valores normais dos índices somáticos, mas não foram observados efeitos citotóxicos de redução da viabilidade celular. A FSP foi altamente tóxica para *V. fischeri* causando maior inibição da fluorescência que o controle positivo para este teste (fenol). Em *A. cepa*, a FSP causou aumento da frequência de micronúcleos, já a FSG induziu danos mais severos, como aumento do índice mitótico, da frequência de micronúcleos, de aberrações cromossômicas e do índice de mutagenicidade.

Palavras-chave: bioensaio; hidrocarbonetos aromáticos; biomarcadores.

ABSTRACT

Petroleum and distilled products are complex mixtures, contents a wide variety of toxic hydrocarbons. The mode of action, the environmental behavior and the effects on organisms caused by these environmental contaminants, involve several variables, such as its physical and chemical characteristics, properties of its individual components, as well as the interactions between them, with the environment and organisms. In attempting to integrate some of these variables, in this work were evaluated the ecotoxicological effects of water-soluble fraction of petroleum (WSFP) and gasoline (WSFG) in different organisms, tests and biomarkers, that were associated with chemical analysis. The toxic effects of soluble fractions were evaluated in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* and *Astyanax serratus* and also in standardized exotic fish *Danio rerio*. Were performed acute lethality tests to estimate the median lethal concentration (LC₅₀) and sublethal assay, to assess genetic, cellular, hematological and somatic biomarkers. The sublethal assay were conducted with exposure and depuration periods. Toxicity tests were also performed with the bacterium *Vibrio fischeri* to estimate the median toxic effect concentration (EC₅₀) and the *Allium cepa* plant system was used to assess the cyto-genotoxic and mutagenic potential of compounds. In general, the WSFG presented higher concentration of solubilized aromatic hydrocarbons and was more toxic than the WSFP. The LC₅₀ of WSFG ranged from 15 to 20%, depending on the species, since the WSFP did not cause lethality. Both the contaminants increased DNA damage in several fish tissue, induced nuclear abnormalities, caused changes in the frequency of immature erythrocytes and alterations of somatic indices. Cytotoxic effect of reducing cell viability was not observed. The WSFP was highly toxic to *V. fischeri*, causing greater inhibition of fluorescence than positive control for this test (phenol). In *A. cepa*, the WSFP increased the frequency of micronuclei, and the WSFG induced more severe damages, like increase in the mitotic index, in the frequency of micronuclei, chromosome aberrations and mutagenicity index.

Keywords: bioassay; aromatic hydrocarbons; biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

- Figura 1.** Torre de fracionamento de petróleo. Adaptado de: <http://diariodopresal.wordpress.com>.....26
- Figura 2.** Estrutura química dos compostos BTEX. 1- Benzeno, 2- Tolueno, 3- Etilbenzeno, 4- orto-xileno, 5- meta-xileno, 6- para-xileno. Fonte: Adaptado de Weelink *et al.* (2010).28
- Figura 3.** Estrutura molecular dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 2007). 1-Naftaleno, 2- Acenaftileno, 3-Acenafteno, 4- Fluoreno, 5- Fluoranteno, 6- Benzo(a)antraceno, 7- Fenantreno, 8- Antraceno, 9- Pireno, 10- Benzo(g,h,i,)perileno, 11- Benzo(a)pireno, 12- Benzo(b)fluoranteno, 13- Indenol(1,2,3,-cd)pireno, 14- Benzo(K)fluoranteno, 15- Dibenzo(a,h)antraceno e 16- Criseno. Fonte: Queiroz *et al.* (2009).30
- Figura 4.** Sistema Microtox® para análise de toxicidade em *Vibrio fischeri*. Fonte: a autora.33
- Figura 5.** *Astyanax altiparanae* (Characidae). Fonte: a autora.35
- Figura 6.** *Astyanax serratus* (Characidae) com secção medular. Fonte: a autora. ...35
- Figura 7.** *Danio rerio* (Cyprinidae). Fonte: info.noldus.com35
- Figura 8.** Injeção intraperitoneal em *A. altiparanae* (Characidae). Fonte: a autora. .36
- Figura 9.** Exposição trófica. *Rhamdia quelen* (Siluriforme) sendo alimentado com uma preparação de ração comercial, gelatina incolor sem sabor e o xenobiótico. Fonte: Moiana-Costa *et al.* (2010).37

Figura 10. Exposição trófica de <i>Hoplias intermedius</i> (Erythrinidae) sendo alimentado com indivíduos de <i>A. altiparanae</i> (Characidae) que previamente receberam uma dose do contaminante. Fonte: Vicari, 2012.	37
Figura 11. Exposição hídrica de <i>A. altiparanae</i> (Characidae). Fonte: a autora.	38
Figura 12. Análise automatizada do ensaio cometa utilizando microscópio de fluorescência Zeiss, com câmera CCD monocromática, objetiva de 20X, programa Metafer 4 – Comet Scan – Metasystems. Região da cabeça delimitada entre as linhas vermelhas e final da cauda marcado pela linha azul. Valor no quadrante superior esquerdo indica o número do nucleóide capturado na lâmina; valor superior direito representa o momento da cauda; valor inferior esquerdo indica o comprimento de cauda (μm) e o número inferior direito indica o % de DNA na cauda do cometa. Fonte: a autora.	51
Figura 13. Sistema teste <i>Allium cepa</i> . Exposição ao contaminante, germinação das sementes e visualização das células sob microscopia de luz. Fonte: a autora.	53
Figura 14. Nucleóides do ensaio de difusão do DNA. Aumento 400x. Fonte: a autora.	55
Figura 15. Eritrócitos maduros (EM) e imaturos (EI) de <i>Astyanax altiparanae</i> . Fonte: a autora.	56
Figura 16. Vesícula biliar de <i>Astyanax altiparanae</i>	57

Capítulo 1

Figura 1. Processos de intemperismo do petróleo em ambiente marinho. Fonte: ITOPF, 2011a.	76
Figura 2. Os efeitos nos organismos aquáticos marinhos variam através de um espectro de toxicidade causados especialmente por petróleos leves e destilados até sufocamento por petróleos intermediários, pesados (IFO e HFO) e resíduos intemperizados. Fonte: ITOPF, 2011b.	80

Capítulo 2

Figura 1. Monitoramento da concentração de hidrocarbonetos aromáticos da FSG 100% em diferentes condições e períodos de amostragem. a) hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX), b) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).93

Figura 2. Efeito de letalidade aguda em *Astyanax altiparanae* e *Danio rerio* e estimativa da concentração letal mediana (CL₅₀). Em a) exposição à fração solúvel da gasolina (FSG), b) exposição ao dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇).94

Figura 3. Efeito dose-resposta das espécies *Astyanax altiparanae* e *Danio rerio* obtido através de análise de regressão. Em a) exposição à fração solúvel da gasolina (FSG), b) exposição ao dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇).96

Capítulo 3

Figura 1. Eritrócitos periféricos de *A. altiparanae*: a) normal; b) micronúcleo (MN); c) notched (NT); d) lobed (LB); e) blebbed (BL); f) binúcleo (BN); g) vacuolated (VC). Aumento de 1000x.113

Figura 2. Células do sangue periférico de *A. altiparanae*. Aumento de 1000x.115

Capítulo 4

Figura 1. Danos no DNA de *A. altiparanae* avaliados através do ensaio cometa em células do sangue; fígado; brânquia; ovário e espermatozóides. Tratamentos: controle negativo (CN); exposição à FSG 1,5% (v/v) por 96 horas (FSG 96h); depuração gradual (DG); depuração total de 15 dias (DEP 15) e depuração total de 30 dias (DEP 30).135

Figura 2. Frequência de eritrócitos imaturos de *A. altiparanae* após exposição à FSG 1,5% (v/v) por 96 horas (FSG 96h) e após períodos de depuração, sendo depuração gradual (DG) e total de 15 (DEP 15) e 30 dias (DEP 30).136

Figura 3. Concentração de metabólitos de HPAs com 2, 4, 5 e 6 anéis benzênicos na bile de *A. altiparanae*, após 96 horas de exposição à FSG 1,5% (v/v) (FSG 96h) e após

períodos de depuração, sendo depuração gradual (DG) e total de 15 (DEP 15) e 30 dias (DEP 30). 139

Figura 4. Índices somáticos de *A. altiparanae* após 96 horas de exposição à FSG 1,5% (v/v) (FSG 96h) e após períodos de depuração, sendo depuração gradual (DG) e total de 15 (DEP 15) e 30 dias (DEP 30). Em a) fator de condição de Fulton (K_f); b) índice hepatossomático (IHS); c) índice gonadossomático de fêmeas (IGS) e d) índice gonadossomático de machos (IGS). 141

Capítulo 5

Figura 1. Efeito tóxico inibitório da bioluminescência de *Vibrio fischeri* em 5 e 15 minutos de exposição à fração solúvel do petróleo (FSP % v/v), e após 5 minutos de exposição ao fenol (mg.L^{-1}). Concentração de efeitos tóxico mediano (CE_{50}) indicada pela linha tracejada. 158

Figura 2. Danos no DNA de *Astyanax serratus* avaliados após exposição à fração solúvel do petróleo por 96 horas (FSP 96h) e 15 dias (FSP 15d) e posteriores períodos de depuração de 15 (DEP 15), 30 (DEP 30) e 60 dias (DEP 60). Controle negativo hídrico (CN), controle positivo com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (CP) e controle negativo com injeção intraperitoneal de PBS (CN inj). Percentual de DNA da cauda obtido através do ensaio cometa em diferentes tecidos: sangue; fígado; brânquia; rim anterior; ovário; espermatozóides e cérebro. 165

Figura 3. Teste do micronúcleo písceo em eritrócitos de *Astyanax serratus* avaliados após exposição à fração solúvel do petróleo por 96 horas (FSP 96h) e 15 dias (FSP 15d) e posteriores períodos de depuração de 15 (DEP 15), 30 (DEP 30) e 60 dias (DEP 60). Controle negativo hídrico (CN), controle positivo com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (CP) e controle negativo com injeção intraperitoneal de PBS (CN inj). Em: a) frequência de micronúcleos; b) frequência de alterações morfológicas nucleares. 167

Figura 4. Frequência de eritrócitos imaturos de *Astyanax serratus* avaliados após exposição à fração solúvel do petróleo por 96 horas (FSP 96h) e 15 dias (FSP 15d) e posteriores períodos de depuração de 15 (DEP 15), 30 (DEP 30) e 60 dias (DEP 60).

Controle negativo hídrico (CN), controle positivo com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (CP) e controle negativo com injeção intraperitoneal de PBS (CN inj).
..... 167

Figura 5. Índices somáticos de *Astyanax serratus* avaliados após exposição à fração solúvel do petróleo por 96 horas (FSP 96h) e 15 dias (FSP 15d) e posteriores períodos de depuração de 15 (DEP 15), 30 (DEP 30) e 60 dias (DEP 60). Controle negativo hídrico (CN), controle positivo com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (CP) e controle negativo com injeção intraperitoneal de PBS (CN inj). Em: a) fator de condição de Fulton (K_f); b) índice hepatossomático (IHS)..... 170

LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1. Parâmetros utilizados para expressão dos resultados do teste de toxicidade aguda letal em peixes.	44
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo 1

Tabela 1. Caracterização físico-química do petróleo.	73
Tabela 2. Caracterização físico-química da gasolina.....	77

Capítulo 2

Tabela 1. Concentração de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) da fração solúvel da gasolina (FSG 100%), mensurados imediatamente após a preparação da amostra (tempo 0 hora).	92
Tabela 2. Fontes de variação do teste de letalidade aguda nas espécies <i>D. rerio</i> e <i>A. altiparanae</i>	97
Tabela 3. Variáveis físico-químicas mensuradas nos tratamentos com a fração solúvel da gasolina (FSG) e dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).	98

Capítulo 3

Tabela 1. Concentração de hidrocarbonetos aromáticos na fração solúvel da gasolina e porcentagem de perda.	112
Tabela 2. Frequência de anomalias nucleares (‰AN) de <i>A. altiparanae</i> após períodos de exposição à fração solúvel da gasolina (FSG) e subsequente depuração.	113

Tabela 3. Células do sangue de <i>A. altiparanae</i> após períodos de exposição e depuração à FSG.	116
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 4. Contagem diferencial leucocitária em <i>A. altiparanae</i> após períodos de exposição e depuração à FSG.	116
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Capítulo 4

Tabela 1. Concentração de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) da fração solúvel da gasolina (FSG) e percentual de perda dos compostos.	132
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 2. Frequência (%) de anomalias nucleares em <i>Astyanax altiparanae</i> após exposição e depuração à fração solúvel da gasolina (FSG).	133
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 3. Avaliação de citotoxicidade através do ensaio de difusão do DNA mensurados em diferentes tecidos, após períodos de exposição e depuração à FSG.	138
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Capítulo 5

Tabela 1. Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) da fração solúvel do petróleo (FSP) amostrados na maior e menor concentração nos aquários de teste de letalidade aguda durante o período inicial e final da exposição.....	160
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 2. Coeficiente de partição octanol-água (Log Kow) e concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) da fração solúvel do petróleo (FSP) utilizada no experimento subletal em peixes e de toxicidade em <i>V. fischeri</i>	161
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 3. Avaliação de citotoxicidade através do ensaio de difusão do DNA mensurados em diferentes tecidos após períodos de exposição e depuração à FSP.	168
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Capítulo 6

Tabela 1. Concentração de hidrocarbonetos aromáticos totais na fração solúvel do petróleo e da gasolina.181

Tabela 2. Porcentagem de células em cada fase de divisão celular.....182

Tabela 3. Frequência de aberrações cromossômicas, micronúcleos, anomalias nucleares e índice de mutagenicidade em células meristemáticas de *A. cepa* após exposição à fração solúvel do petróleo e da gasolina.185

LISTA DE ABREVIATURAS

% (v/v): porcentagem volume/volume

°API: grau API - *American Petroleum Institute*

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

AC: aberrações cromossômicas

AMN: alterações morfológicas nucleares

AN: anomalias nucleares

ANOVA: análise de variância

ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ASTM: Sociedade Americana de Testes e Materiais - *American Society for Testing and Materials*

BL: blebbed

BN: binúcleo

BTEX: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos

C: comprimento em centímetros

CAS: *Chemical abstracts service*

CE₅₀: concentração de efeito tóxico mediano

CENO: concentração de efeito não observado

CEzero: concentração efetiva zero

CG/FID: cromatografia gasosa/detector de ionização de chama

CL₅₀: concentração letal mediana

CN inj: controle negativo com injeção intraperitoneal

CN: controle negativo hídrico

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

CONSEMA: Conselho Estadual do Meio Ambiente

CP: controle positivo

DEP 15: depuração total por 15 dias

DEP 30: depuração total por 30 dias

DEP 60: depuração total por 60 dias

DG: depuração gradual

DIN: Instituto Alemão de Normatização - *Deutsches Institut für Normung*

E.g.:– por exemplo - *exempli gratia*

EI: eritrócitos imaturos

EM: eritrócitos maduros

ETBE: éter metil-terc-butilíco

EU: Europa

FD: fator de diluição

FSG 96h: exposição à fração solúvel da gasolina por 96 horas

FSG: fração solúvel da gasolina

FSP 15d: exposição à fração solúvel do petróleo por 15 dias

FSP 96h: exposição à fração solúvel do petróleo por 96 horas

FSP: fração solúvel do petróleo

FT: fator de toxicidade

HFO: petróleo pesado – *heavy fuel oil*

HPAs: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HPLC/UV-FL: cromatografia líquida de alta eficiência/detector ultravioleta-detector de fluorescência

IAD: índice antidetonante

IARC: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer - *International Agency for Research on Cancer*

IFO: petróleo intermediário - *intermediate fuel oil*

IGS: índice gonadossomático

IHS: índice hepatossomático

IM: índice mitótico

IMt: índice de mutagenicidade

ISO: Organização Internacional para Padronização – *International Organization for Standardization*

ITOPF: *The International Tanker Owners Pollution Federation Limited*

K_f: fator de condição de Fulton

LACAUT: Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos

LB: lobed

LMP: agarose de baixo ponto de fusão – *low melting point*

LOEC: menor concentração de efeito observado - *lowest observable effect concentration*

Log K_{ow}: coeficiente de partição octanol/água

LSD: mínima diferença significativa - *least significant difference*

MMS: metil metanosulfonato

MN: micronúcleo

MNT: teste do micronúcleo písceo

MON: número octano motor - *motor octane number*

MTBE: metil tert-butil éter

NOAEC: concentração de efeito adverso não observado - *no observed adverse effect concentration*

NT: notched

NTP: Normas Técnicas da Petrobras

OD: oxigênio dissolvido

OECD: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - *Organization for Economic Co-operation and Development*

P: peso em gramas

pH: potencial hidrogeniônico

PM: peso molecular

RON: *Research octane number*

RPM: rotações por minuto

SBF: soro bovino fetal

SCGE: eletroforese em gel de célula individualizada - *single-cell gel electrophoresis*

SM: Métodos Padronizados - *Standard methods*

Tep: toneladas equivalentes de petróleo

US EPA: Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América - *United States Environmental Protection Agency*

VC: vacuolated

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR PETRÓLEO E COMPOSTOS DERIVADOS ...	25
2.2 ECOTOXICOLOGIA.....	30
2.3 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS.....	32
2.3.1 Teste de toxicidade com a bactéria <i>Vibrio fischeri</i>	32
2.3.2 Testes de toxicidade com peixes.....	33
2.3.3 Teste de letalidade aguda em peixes.....	39
2.4 BIOMARCADORES	46
2.4.1 Biomarcadores de genotoxicidade	47
2.4.1.1 Teste do micronúcleo	48
2.4.1.2 Ensaio cometa	49
2.4.1.3 Sistema <i>Allium cepa</i>	52
2.4.2 Biomarcadores de citotoxicidade	54
2.4.2.1 Ensaio de difusão do DNA.....	54
2.4.2.2 Citotoxicidade eritropoiética	55
2.4.3 Análise de HPAs na bile	56
REFERÊNCIAS	58
3 OBJETIVOS.....	68
3.1 OBJETIVO GERAL	68
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	68
CAPÍTULO 1	70
Petróleo e gasolina: características físico-químicas e implicações ambientais.	70
Resumo.....	70
Introdução	71
Material e Métodos.....	72
Resultados e discussão	72
Considerações finais	80
Referências.....	81
CAPÍTULO 2.....	86
A escolha entre peixes nativos ou exóticos em testes ecotoxicológicos: balanço entre a relevância ecológica e a padronização.....	86
Resumo.....	86
Material e Métodos.....	89

Resultados	91
Discussão	99
Considerações finais	101
Referências	102
CAPÍTULO 3	107
Análise genotóxica eritrocítica e hematológica leucocitária em <i>Astyanax altiparanae</i> (Characidae) após períodos de exposição e depuração da fração solúvel da gasolina (FSG)	107
Resumo.....	107
Introdução	108
Material e Métodos.....	109
Resultados e discussão	111
Referências.....	117
CAPÍTULO 4	123
Exposição e depuração da fração solúvel da gasolina sob a perspectiva de múltiplos biomarcadores	123
Resumo.....	123
Introdução	124
Material e Métodos.....	126
Resultados e discussão	129
Considerações finais	141
Referências.....	142
CAPÍTULO 5	149
Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo	149
Resumo.....	149
Introdução	150
Material e Métodos.....	152
Resultados e discussão	156
Considerações finais	170
Referências.....	171
CAPÍTULO 6	176
Efeitos cito-genotóxicos e mutagênico da fração solúvel do petróleo e da gasolina em <i>Allium cepa</i>	176
Resumo.....	176
Introdução	177
Material e Métodos.....	178

Resultados e discussão	180
Considerações finais	186
Referências	186
CONSIDERAÇÕES FINAIS	190
ANEXO	194

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização do petróleo pela sociedade data 4000 anos A.C., mas a fase moderna da indústria petrolífera iniciou-se no século XIX quando o americano Edwin Laurentine Drake perfurou o primeiro poço de petróleo em 1859 (Heinberg, 2007; Hsu e Robinson, 2007).

A partir desse marco, a exploração de petróleo e utilização de seus derivados ficou cada vez mais intensa, assim como os danos ambientais causados por esses processos. O petróleo e seu principal derivado a gasolina, são contaminantes ambientais perigosos que afetam os ecossistemas aquáticos de diversas partes do mundo. Neste trabalho, foi avaliado os efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel destes compostos, devido à sua biodisponibilidade aos organismos aquáticos.

Estudos ecotoxicológicos visam avaliar os efeitos de poluentes no ecossistema, seja através de danos imediatos no organismo, ou indiretamente através de alterações no ambiente, ou ainda mensurando os efeitos não observados em nível de um único organismo, mas em subunidades, como implicações no desenvolvimento, que podem ter consequência em nível populacional (Moriarty, 1999).

Atualmente, os desafios da ecotoxicologia baseiam-se na avaliação, integração e predição dos efeitos de um número crescente de agente químicos estressores nos organismos aquáticos e ecossistemas (Connon *et al.*, 2012).

Neste trabalho foram avaliados os efeitos deletérios da fração solúvel do petróleo (FSP) e da fração solúvel da gasolina (FSG) em diferentes níveis de organização biológica que podem ter implicações severas nas populações naturais, com enfoque em organismos aquáticos.

Em peixes foram utilizados biomarcadores de genotoxicidade, citotoxicidade, alterações hematológicas, bioacumulação e letalidade. Também foi determinada a toxicidade dos compostos para a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* e mensuradas alterações cito-genotóxicas no modelo vegetal *Allium cepa*.

No capítulo 1 é apresentada a caracterização do petróleo cru e da gasolina e buscou-se relacionar as propriedades desses compostos com os aspectos econômicos e suas implicações ambientais.

No capítulo 2 é abordado os efeitos tóxicos agudos de letalidade em peixes da espécie *Astyanax altiparanae* e *Danio rerio*, sendo estimada a concentração letal mediana (CL₅₀) e comparada a sensibilidade dos organismos.

Do capítulo 3 ao 5 estão apresentados os efeitos subletais agudos, subcrônicos e de depuração em peixes expostos à FSP e FSG. O capítulo 3 traz os resultados do teste do micronúcleo písceo e da análise hematológica leucocitária em peixes expostos à FSG.

No capítulo 4 são apresentados os efeitos tóxicos subletais da FSG em *A. altiparanae* em exposição aguda e após depuração, analisados através de biomarcadores em nível genético, celular, hematopoiético e somático, e quantificados os metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile.

No capítulo 5 estão apresentados os efeitos deletérios da FSP em diferentes organismos como a bactéria *Vibrio fischeri* e os peixes *Astyanax serratus* e *D. rerio* em diferentes *endpoints* de toxicidade.

O capítulo 6 apresenta os resultados da análise em sistema vegetal, após germinação de sementes de *Allium cepa* (cebola) em diferentes concentrações da FSP e FSG, sendo avaliado o índice mitótico, a frequência de aberrações cromossômicas, anomalias nucleares e micronúcleos nas células meristemáticas.

No tópico Considerações Finais é realizada uma análise geral dos efeitos induzidos e traçada uma escala de concentração, tempo e efeitos observados entre todos os biomarcadores e organismos utilizados.

No decorrer dos capítulos são apresentadas as concentrações efetivas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e monoaromáticos nas amostras das frações solúveis, caracterização da gasolina bruta e uma breve discussão sobre suas características físico-químicas.

Essas análises físico-químicas, associadas às respostas biológicas, propiciam uma visão mais completa de causalidade. O comportamento e concentração dos compostos orgânicos são dependentes de sua estrutura molecular, que é um fator determinante da transformação metabólica e toxicidade, assim é importante conhecer a composição dos poluentes para entender e prever os efeitos no ambiente natural (Walker *et al.*, 2005).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR PETRÓLEO E COMPOSTOS DERIVADOS

O petróleo é um recurso básico de energia que sustenta as atuais atividades econômicas (Hall *et al.*, 2003). É a principal matriz energética mundial, representado 34,4% do consumo em relação a outras fontes, como: gás natural (20,5%); carvão mineral (26,0%); urânio (6,2%); hidráulica e eletricidade (2,2%) e biomassa (10,7%) de um total de 11.741 milhões de tep² (MME, 2009).

Apesar do uso do petróleo ter sido reduzido em comparação à década de 1970, em que representava 50% da fonte energética mundial, ainda é predominante em relação às formas alternativas de geração de energia (MME, 2009).

Vários produtos são obtidos a partir do refino de petróleo, principalmente combustíveis e lubrificantes. O petróleo também é utilizado pela indústria petroquímica para a produção de produtos farmacêuticos, têxteis e plásticos (Radovic e Schobert, 1992) e dos resíduos pesados é obtido o betume (ARMA, 2011), coque, alcatrão e parafinas, que são utilizados para diversos fins, como na produção de asfalto, calafetagem, adesivos para construção, entre outros (Speight, 1997).

Na torre de fracionamento de petróleo ocorre a separação dos compostos por destilação de acordo com sua volatilidade (indicada como ponto de ebulição). Os vapores da origem do petróleo bruto aquecido são condensados continuamente à medida que ascendem na coluna. Hidrocarbonetos menores, são mais voláteis e têm menor ponto de ebulição e assim seus vapores sobem mais na torre de fracionamento (Radovic e Schobert, 1992). Em ordem crescente de ponto de ebulição são obtidos os seguintes destilados: gás, nafta, gasolina, querosene, diesel, óleos lubrificantes, combustível náutico/industrial e resíduos (Figura 1).

² tep: toneladas equivalentes de petróleo, definida como o calor liberado na combustão de uma tonelada de petróleo cru, sendo de aproximadamente 42 gigajoules (42 GJ) (OECD, 1995).

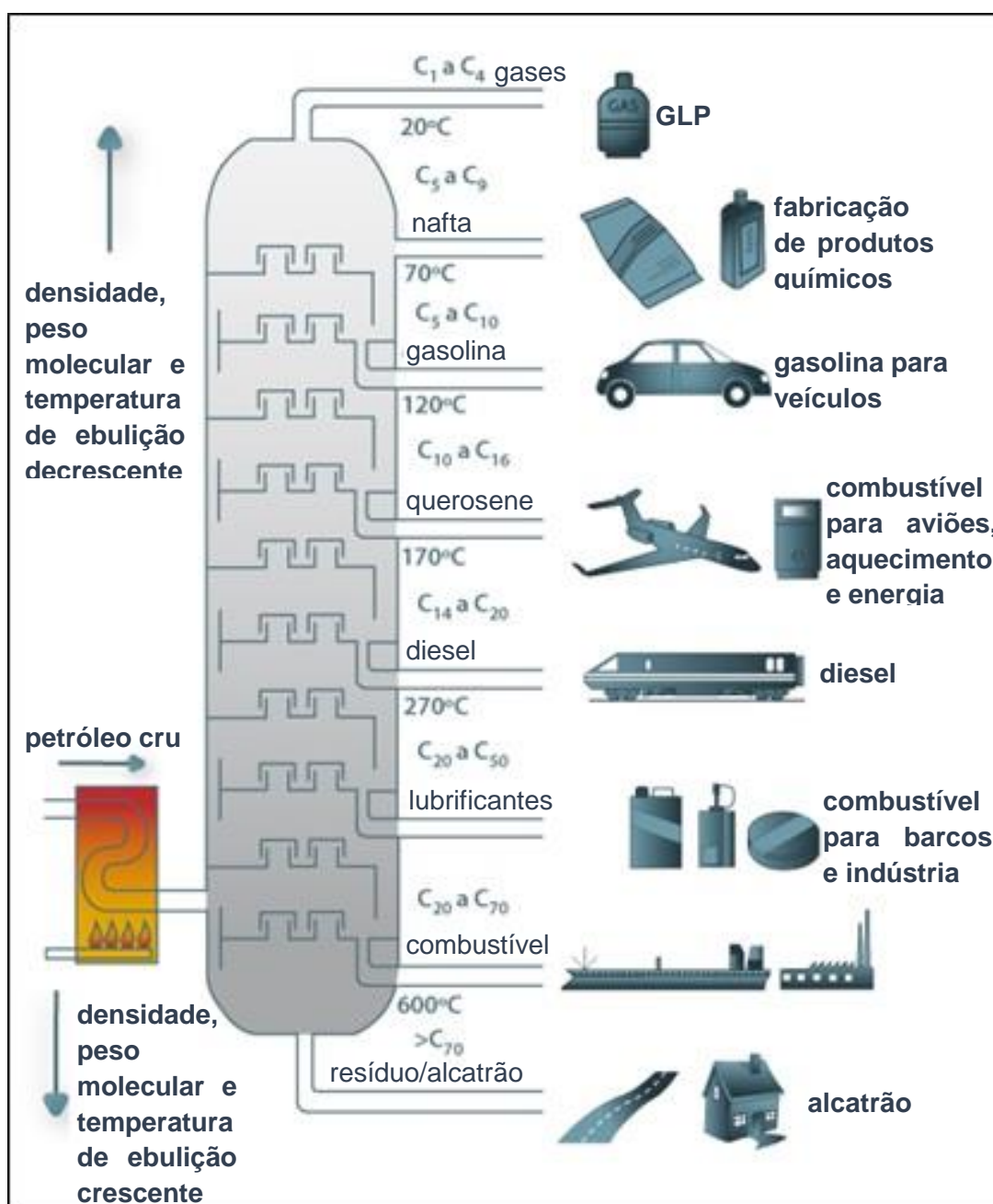


Figura 1. Torre de fracionamento de petróleo. Adaptado de: <http://diariodopresal.wordpress.com>

A intensa exploração de petróleo tem causado diversos impactos ambientais, principalmente nos ecossistemas aquáticos (Pedrozo *et al.*, 2002). Entre os diversos tipos de contaminantes relacionados às atividades antrópicas, os produtos do petróleo são uns dos que apresentam maior relevância ecotoxicológica (Pacheco e Santos, 2001).

A contaminação ambiental por petróleo ocorre frequentemente como resultado de acidentes em plataformas, vazamentos de tanques de armazenamento

subterrâneos, durante o transporte e pela descarga de efluentes industriais. Os acidentes ocorrem em todo o mundo, sendo estimado que anualmente ocorram derramamentos de petróleo na ordem de 1.300.000 toneladas métricas (National Research Council, 2003). No Brasil, os maiores eventos de poluição estão relacionados à ruptura de oleodutos e derramamentos a partir de navios petroleiros (Meniconi *et al.*, 2002).

A contaminação por petróleo abrange diferentes estágios do processamento industrial, desde a extração até o refino (Meniconi *et al.*, 2002). De acordo com Chang e Lin (2006), 74% dos acidentes ocorrem em refinarias de petróleo, terminais ou locais de armazenamento, superando os acidentes em derramamentos durante a extração e transporte (Kennish, 1992). Resíduos ou produtos da decomposição do petróleo acabam alcançando o lençol freático ou águas superficiais, utilizadas para o uso potável, doméstico e industrial (Sunday *et al.*, 2007), e persistem no sedimento por longos períodos (Reddy *et al.*, 2002).

Derramamentos de petróleo e derivados têm colocado em risco de extinção organismos aquáticos oceânicos e continentais (Verlecar *et al.*, 2006; Ingle *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003), tendo consequências severas para o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, através da indução de eventos de mortalidade em massa que atingem diferentes táxons ou por causar alterações subletais, como comprometimento da reprodução. Esses impactos levam a alterações na estrutura das comunidades mesmo depois de anos após um evento de derramamento (Anjos *et al.*, 2011).

Os desastres ambientais não comprometem apenas os organismos locais, mas podem atingir grandes áreas através da dispersão dos compostos. No Sul do Brasil, em 2004, houve a explosão de um navio carregado com milhares de toneladas de metanol e derivados de petróleo que foram dispersados a uma distância de mais de 30 Km, atingindo inclusive áreas de preservação ambiental (Katsumiti *et al.*, 2008).

A gasolina é o produto mais importante do refino de petróleo, sendo utilizada como combustível para motores de ignição por centelha e representa 46,6% do total de derivados produzidos. Estima-se que para produção de 20 barris de gasolina sejam necessários 100 barris de petróleo (Radovic, 1997). No Brasil o consumo de gasolina é de aproximadamente 110.000.000 L por dia (ANP, 2013).

Além da grande demanda desse combustível em automóveis, a gasolina também é utilizada em barcos costeiros, desta forma, vazamentos de combustíveis

durante as atividades de navegação e recreação contribuem para o aumento da contaminação da água por hidrocarbonetos (Pacheco e Santos, 2001; Desai *et al.*, 2010). A contaminação da água também pode ocorrer através de vazamentos em tanques de armazenamento subterrâneos que atingem o lençol freático (ANP, 1996) e pela descarga de efluentes de postos de combustíveis que mesmo após tratamento, contém substâncias tóxicas (Oliveira-Martins e Grisolia, 2009).

A gasolina é constituída por centenas de substâncias químicas que pertencem a duas classes principais: hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (Pacheco e Santos, 2001) consistindo principalmente de moléculas com 9 átomos de carbono (Radovic, 1997).

A fração solúvel do petróleo e derivados como a gasolina é constituída por uma mistura de hidrocarbonetos, os monoaromáticos, frequentemente denominados de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) (Figura 2), e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Figura 3), fenóis e compostos heterocíclicos, contendo nitrogênio, enxofre (Rodrigues *et al.*, 2010) e concentrações traço de metais como ferro, níquel, cobre e vanádio (Woodle e Chandler Jr., 1952; Speight, 1997).

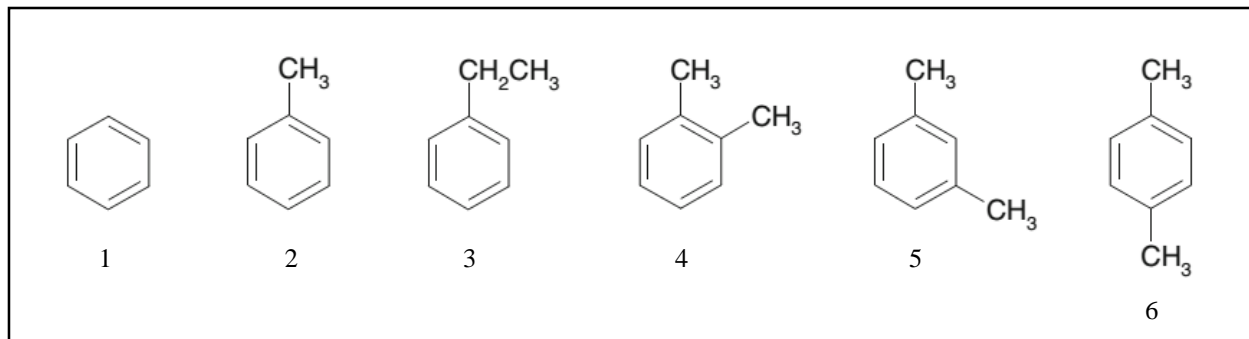


Figura 2. Estrutura química dos compostos BTEX. 1- Benzeno, 2- Tolueno, 3- Etilbenzeno, 4- orto-xileno, 5- meta-xileno, 6- para-xileno. Fonte: Adaptado de Weelink *et al.* (2010).

Devido a ampla utilização e irregularidades associadas ao processo produtivo do petróleo, esses compostos como BTEX e HPAs têm sido detectados em altas concentrações no solo, sedimentos e águas subterrâneas (Weelink *et al.*, 2010).

Entre os diversos tipos de hidrocarbonetos presentes no petróleo e derivados, os policíclicos aromáticos são os contaminantes ambientais mais perigosos em função de seus efeitos tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (Aina *et al.*, 2006; Desai *et al.*, 2010) ou são precursores de metabólitos carcinogênicos, como o benzo(a)pireno (Newman e Unger, 2002). Esses hidrocarbonetos constituem uma classe diversificada de moléculas orgânicas hidrofóbicas que são contaminantes ambientais (Harvey,

1997), essa classe de contaminantes é considerada como prioritária em monitoramentos pelas agências de regulamentação ambiental (Beyer *et al.*, 2010) (Figura 3).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são contaminantes invasivos de habitats aquáticos, como rios, lagos e ambientes costeiros marinhos, presentes principalmente em áreas urbanizadas (Incardona, 2004). A maior fração entra no ambiente aquático marinho por escoamento terrestre ou deposição atmosférica (National Research Council, 2003).

Os HPAs são compostos com dois ou mais anéis aromáticos fundidos e podem variar amplamente em suas propriedades devido a grande variedade de tamanhos e massa molecular (Newman e Unger, 2002). Compostos com grande massa molecular são considerados hidrofóbicos e tendem a acumular em sedimentos e nos organismos. Já os compostos de menor massa molecular têm propriedades tóxicas agudas (Newman e Unger, 2002).

Embora os HPAs possam ser metabolizados pelos organismos vertebrados através dos sistemas citocromo P450, eles podem ser acumulados em invertebrados, que tem sua atividade metabólica reduzida. Em peixes, a acumulação de hidrocarbonetos solúveis é extremamente rápida (Gravato e Santos, 2002) e esses compostos são metabolicamente degradados por biotransformação enzimática, sendo um mecanismo essencial para o modo de ação de genotóxicos (Beyer *et al.*, 2010).

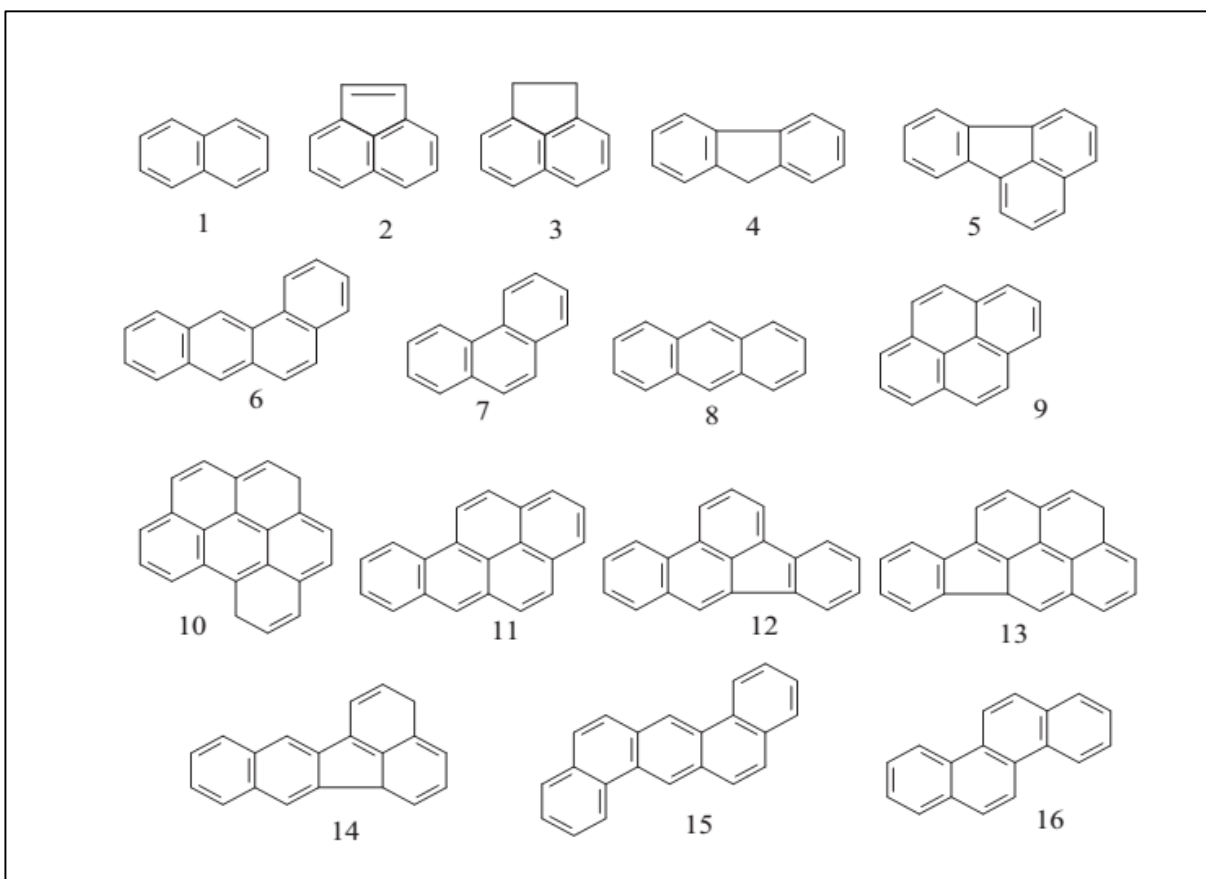


Figura 3. Estrutura molecular dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 2007). 1-Naftaleno, 2-Acenaftileno, 3-Acenafteno, 4- Fluoreno, 5- Fluoranteno, 6- Benzo(a)antraceno, 7- Fenantreno, 8- Antraceno, 9- Pireno, 10- Benzo(g,h,i,)perileno, 11- Benzo(a)pireno, 12- Benzo(b)fluoranteno, 13- Indenol(1,2,3,-cd)pireno, 14- Benzo(K)fluoranteno, 15- Dibenzo(a,h)antraceno e 16- Criseno. Fonte: Queiroz *et al.* (2009).

2.2 ECOTOXICOLOGIA

A ecotoxicologia foi definida pela primeira vez por Truhaut (1969) como uma extensão natural da toxicologia que descreve o efeito tóxico de vários agentes em organismos vivos, comunidades e populações. De acordo com Alcaraz (2000), a toxicologia objetiva identificar os poluentes e descrever seus mecanismos tóxicos e efeitos fisiológicos em animais e seus componentes.

Essencialmente, a ecotoxicologia abrange duas áreas principais: o estudo do ambiente, com origem na ecologia, e o estudo das interações de substâncias tóxicas nos organismos vivos, objeto da toxicologia, sendo uma ciência multidisciplinar, que

envolve conhecimentos das áreas de química, biologia, farmacologia, epidemiologia, fisiologia e ecologia (Connell *et al.*, 1999).

O termo ecotoxicologia pode ser definido como o estudo dos efeitos de contaminantes em sistemas ecológicos ou em seus componentes, que incluem indivíduos, populações, comunidades e compartimentos abióticos em que se encontram (Jorgensen, 2010).

A junção da toxicologia com a ecologia originou uma linha científica com uma abordagem holística, que investiga os efeitos tóxicos causados por poluentes e objetiva quantificar e prever a magnitude de estresse em populações naturais, comunidades ou ecossistemas, sendo uma importante ferramenta para prevenção de impactos sobre os ecossistemas e restauração de seus serviços e funções (Moriarty, 1999).

Baseando-se em alterações em uma unidade do ecossistema, pode-se avaliar o efeito de poluentes em indivíduos, populações, comunidades ou e/ou ecossistemas, que comprometem a composição e função ambiental (Brouwer *et al.*, 1990). A ecotoxicologia avalia, através de variadas técnicas, o impacto ambiental de contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (Elliot *et al.*, 2010).

Segundo Winteringham (1977), o termo ecotoxicologia é adotado como um estudo comparativo e integrado dos efeitos tóxicos de contaminantes sobre a fauna e flora, ou ecossistema ou sobre uma unidade definida destes. É o estudo do destino e efeito de substâncias tóxicas no ecossistema baseado em pesquisas de campo e de laboratório (Kendall, 1992; Hoffman *et al.*, 1995), que utiliza respostas espécie-específicas ou impactos em elevados níveis de organização (Kendall, 2001). É uma análise crítica dos efeitos adversos que podem ocorrer após exposição a um ou mais agentes estressores, sendo fundamental para a avaliação de risco ecológico (Newman, 1996).

O desenvolvimento de ensaios para o monitoramento de contaminantes nocivos no ambiente é necessário devido à crescente descarga de poluentes em ecossistemas naturais, especialmente pelos efeitos sinérgicos e antagônicos que podem ocorrer sobre os organismos vivos, particularmente sobre populações e comunidades.

De acordo com Jha (2008), a simples detecção de contaminantes em compartimentos abióticos e bióticos não é suficiente, existindo a necessidade de que seus efeitos biológicos ou ecológicos sejam devidamente avaliados. Além disso, os

contaminantes no ambiente ocorrem muitas vezes como misturas complexas, e o risco de tais misturas pode conduzir a uma discrepância entre os riscos reais e os preditos de um contaminante através de uma substância específica avaliada (Jha, 2008).

Os testes ecotoxicológicos permitem, sob condições controladas, determinar as concentrações dos agentes químicos que causam efeitos danosos aos organismos aquáticos e têm ampla utilização no desenvolvimento de padrões e/ou critérios de qualidade para a proteção das comunidades (Bertoletti, 2000). Aliados às análises físico-químicas, estes testes apresentam caráter preditivo sobre os efeitos tóxicos e/ou propriedades genotóxicas dos contaminantes, proporcionando uma avaliação mais completa e integrada.

2.3 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

Os testes ecotoxicológicos podem ser aplicados para determinar a sensibilidade do organismo em relação a um agente tóxico, avaliar a qualidade da água, as concentrações seguras de agentes químicos (Metcalf *et al.*, 2003), monitorar a toxicidade de efluentes (CONAMA, 357/2005), e indicar possíveis riscos ao ambiente, servindo assim como sistemas preventivos de proteção e alerta (Knie e Lopes, 2004).

A toxicidade é uma propriedade que reflete o potencial de uma substância em causar um efeito danoso a um organismo vivo. Ela depende da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto e também do tempo de exposição (Rand *et al.*, 1995).

2.3.1 Teste de toxicidade com a bactéria *Vibrio fischeri*

O teste de toxicidade com a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri* é um ensaio rápido, confiável e normalizado, sendo ideal para compilação de dados toxicológicos que podem ser comparados e analisados estatisticamente para estabelecer correlações entre a toxicidade e a estrutura química ou propriedades dos

compostos avaliados (Jurado *et al.*, 2012), podendo ser aplicado para detecção de agentes tóxicos da água, solo e sedimentos (US EPA, 2003).

O teste é realizado através análise da bioluminescência da bactéria marinha *V. fischeri* que é sensível à uma ampla variedade de compostos que reduzem sua luminescência de forma diretamente proporcional à toxicidade da amostra, sendo a luminescência analisada através de fluorímetros, como o Microtox® (Figura 4).

Bactérias luminescentes produzem luz como um produto da respiração celular, que é fundamental para o metabolismo e processos biológicos. Agentes tóxicos inibem a atividade celular resultando no decréscimo da taxa de respiração e consequentemente diminuem a luminescência (US EPA, 2003).

Para a realização do teste, a bactéria liofilizada é reconstituída em uma solução salina e adicionada nas amostras em uma série de diluições e controle negativo. A leitura da fluorescência é realizada no tempo 0 e após 5 e 15 minutos e os resultados são utilizados para calcular a porcentagem de inibição nos períodos avaliados e estimar a concentração de efeito tóxico mediano (CE₅₀).



Figura 4. Sistema Microtox® para análise de toxicidade em *Vibrio fischeri*. Fonte: a autora.

2.3.2 Testes de toxicidade com peixes

Em relação a outros grupos de organismos utilizados em estudos ecotoxicológicos, os peixes apresentam várias vantagens: representam o maior e mais diverso grupo entre os vertebrados (Powers, 1989); com respostas de alta

relevância ecológica à exposição a agentes tóxicos (Van der Oost e Beyer, 2003) e usualmente de forma semelhante a outros vertebrados (Al-Sabti e Metcalfe, 1995); acumulam substâncias tóxicas, respondem a baixas concentrações de mutágenos; formam diversos elos na teia trófica (Çavas e Ergene-Gözükara, 2005) e podem ser utilizados *in vivo*, em bioensaios e biomonitoramento.

As espécies *Astyanax altiparanae* (Figura 5) e *Astyanax serratus* (Figura 6) da família Characidae foram utilizadas neste estudo por serem representantes de peixes nativos neotropicais. Já a espécie *Danio rerio* (Cyprinidae) (Figura 7) foi utilizada como organismo exótico referência por ser padronizada para testes ecotoxicológicos.

A utilização de espécies nativas em estudos ecotoxicológicos pode propiciar uma avaliação mais realística do impacto ambiental em seus ecossistemas do que o uso de organismos exóticos. Na região neotropical algumas espécies nativas têm sido utilizadas em bioensaios e/ou como bioindicadoras de contaminação ambiental como *Rhamdia quelen* (Pamplona *et al.*, 2011); *Hoplias malabaricus* (Vicari *et al.*, 2012); *Geophagus brasiliensis* (Osório *et al.*, 2013); *Prochilodus lineatus* (Vanzella *et al.*, 2007) e *Astyanax bimaculatus* (Matsumoto e Cólus, 2000; Silva *et al.*, 2010).

A família Characidae é a maior e mais complexa da ordem Characiformes (Britski *et al.*, 2007), engloba a maior parte dos peixes brasileiros de água doce, incluindo também a grande maioria dos peixes de escama, possuem hábitos alimentares diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e ocupam uma grande variedade de habitats (Britski, 1972). A família é constituída por aproximadamente 1.100 espécies e mais de 300 foram descritas na última década na região Neotropical (Oliveira *et al.*, 2011).

A subfamília Tetragonopterinae representa o maior número de espécies no Brasil, sendo conhecida pelo fato de nela estarem incluídos os peixes vulgarmente chamados de lambaris. Essa subfamília está representada por toda a América do Sul e Central, estendendo-se da fronteira do México com os Estados Unidos até a Argentina (Britski, 1972). O gênero *Astyanax* inclui peixes de pequeno porte, comuns nas bacias hidrográficas neotropicais e compreende aproximadamente uma centena de espécies (Garutti, 1999).



Figura 5. *Astyanax altiparanae* (Characidae).
Fonte: a autora.



Figura 6. *Astyanax serratus* (Characidae) com secção medular. Fonte: a autora.



Figura 7. *Danio rerio* (Cyprinidae). Fonte: info.noldus.com

Os testes de toxicidade com peixes podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição, sendo agudo, subcrônico e crônico. O teste agudo avalia a capacidade inerente da amostra em produzir efeitos deletérios nos organismos em curto período de exposição em relação ao seu ciclo de vida (CONSEMA, 129/2006). Em peixes, o teste agudo tem duração de até 96 horas (Di Giulio e Hinton, 2008; Jorgensen, 2010).

No teste crônico a resposta a um estímulo é avaliada por um longo período que pode durar parte ou todo o ciclo de vida dos organismos (Zagatto *et al.*, 1992) ou que exceda 10% do tempo de vida do indivíduo (Jorgensen, 2010). Neste tipo de ensaio são avaliados os efeitos subletais, nos quais as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência, no entanto, causam distúrbios em suas funções biológicas (Goldstein, 1988), como efeitos reprodutivos, alteração no desenvolvimento, comportamento e fisiologia (Jorgensen, 2010).

Já o ensaio subcrônico representa um período intermediário entre o ensaio agudo e crônico, sendo capaz de mensurar efeitos de bioacumulação e detectar efeitos que não foram observados através do teste agudo, sendo mais utilizado que o teste crônico por ser mais rápido e menos custoso.

Nos testes com peixes a exposição ao xenobiótico pode ser realizada via injeção intraperitoneal, via trófica ou hídrica (Di Giulio e Hinton, 2008; Almeida e Oliveira Ribeiro, 2013).

A injeção intraperitoneal pode ser aplicada em uma única dose para avaliar o efeito agudo da substância teste ou utilizando mais doses ao longo do tempo (efeito subcrônico), nesta via de exposição é aplicada a dose da substância teste em relação ao peso do organismo, e.g. mg.Kg⁻¹, (Figura 8).



Figura 8. Injeção intraperitoneal em *A. altiparanae* (Characidae). Fonte: a autora.

Na via trófica, o xenobiótico é administrado através do alimento em doses relacionadas ao peso corpóreo, sendo comumente empregado em teste subcrônico. O contaminante pode ser adicionado na preparação da ração (Figura 9) ou através da injeção intraperitoneal em um peixe que servirá de alimento (Figura 10). O tipo de

alimento e a quantidade de doses administradas variam de acordo com o hábito alimentar do organismo e o objetivo do estudo.



Figura 9. Exposição trófica. *Rhamdia quelen* (Siluriforme) sendo alimentado com uma preparação de ração comercial, gelatina incolor sem sabor e o xenobiótico. Fonte: Moiana-Costa *et al.* (2010).



Figura 10. Exposição trófica de *Hoplias intermedius* (Erythrinidae) sendo alimentado com indivíduos de *A. altiparanae* (Characidae) que previamente receberam uma dose do contaminante. Fonte: Vicari, 2012.

A exposição hídrica (Figura 11) em condições laboratoriais pode ser realizada em diferentes sistemas teste: estático; semiestático; fluxo contínuo e recirculação (Di Giulio e Hinton, 2008; Almeida e Oliveira Ribeiro, 2013).

No sistema estático os organismos são expostos à concentração inicial do contaminante e a solução não é renovada no período do teste. No sistema semiestático, parte da solução é renovada periodicamente (e.g. 25% da solução teste a cada 24 horas). No fluxo contínuo a solução passa em todos os aquários de teste sendo renovada e descartada de forma automatizada (OECD, 1992). Já no sistema de recirculação as soluções passam por filtros para manter a qualidade da água e retornam ao aquário de teste (Di Giulio e Hinton, 2008).



Figura 11. Exposição hídrica de *A. altiparanae* (Characidae). Fonte: a autora.

Os testes ecotoxicológicos com peixes podem ser divididos em duas classes principais, a primeira está relacionada a ensaios que avaliam a letalidade, geralmente aplicado em período agudo e via hídrica para determinação da indução de mortalidade em uma série de concentrações do xenobiótico. A segunda classe compreende ensaios subletais, que podem detectar os riscos precoces de exposição a concentrações mais baixas de xenobióticos em comparação ao ensaio de letalidade. Os testes subletais podem ser utilizados para estudo de contaminação por diferentes vias e tempos de exposição para avaliar *endpoints* em diferentes níveis de organização biológica, do organismo ao subcelular, através de biomarcadores.

2.3.3 Teste de letalidade aguda em peixes

A toxicidade aguda pode ser definida como uma crise manifestada em um curto período de tempo, sendo a capacidade de um composto ou mistura em causar dano ou morte (Waller e Allen, 2010).

O teste agudo é conduzido para obter informação sobre os efeitos imediatos nos organismos-teste sob condições experimentais específicas. Os resultados podem ser utilizados para prever os efeitos que podem ocorrer nos organismos aquáticos em ambientes naturais como resultado de exposição compatível. Também podem ser utilizados para comparação de sensibilidade de resposta interespecífica, comparação da toxicidade entre substâncias e para estudar os efeitos de vários fatores ambientais sobre os resultados de tais testes (ASTM, 2007).

Os testes de toxicidade aguda letal em peixes são amplamente utilizados no campo da ecotoxicologia para determinar ou estimar a dose ou concentração de um xenobiótico capaz de induzir letalidade. Fatores de segurança são, então, estimados para assegurar a proteção dos organismos em condições naturais (Knie e Lopes, 2004).

Esses testes são frequentemente aplicados para monitorar e identificar a descarga de compostos tóxicos de efluentes e nos corpos hídricos receptores, permitem o desenvolvimento de padrões de qualidade e a fiscalização ambiental de acordo com os limites legais permitidos (US EPA, 2002).

Os principais protocolos internacionais para a realização dos testes de toxicidade aguda letal em peixes foram desenvolvidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 1996; US EPA, 2002), pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1992), Organização Internacional para Padronização (ISO, 1996) e pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM, 2007). No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2011) estabelece as diretrizes para a realização do teste. Apesar de apresentarem particularidades, o princípio do teste é o mesmo em todos os protocolos, e podem ser complementares. A utilização destes protocolos permite a uniformização do teste, comparação dos resultados entre laboratórios e reprodutibilidade dos ensaios (Costa *et al.*, 2008).

O controle de algumas variáveis como pH, temperatura da água, oxigênio dissolvido, dureza da água e fotoperíodo são indispensáveis para a realização do teste. Entre todos os protocolos o da ABNT (2011) apresenta a maior faixa aceitável de pH sendo de 5,0 à 9,0; já os protocolos da US EPA (1996; 2002) são mais restritivos e definem que o pH deve estar compreendido entre 6,0 e 8,0.

A temperatura da água deve ser a apropriada para cada espécie e constante. Para *Danio rerio*, por exemplo, recomenda-se que a temperatura esteja entre 23 à 27 °C, mas em geral a temperatura durante o ensaio não deve variar mais de 1°C.

A concentração de oxigênio dissolvido deve ser superior a 4,0 mg.L⁻¹ ou 60% de saturação, valores inferiores podem interferir nos resultados devido ao estresse por hipóxia. No entanto, o ensaio de toxicidade deve ser realizado sem aeração, visto que esse procedimento pode alterar os resultados pelo aumento da volatilização dos compostos e por alterar o pH da solução testada. A aeração dos aquários só pode ser feita quando a concentração de oxigênio dissolvido estiver abaixo do necessário, ou se não for causar perda da substância testada. É indicado aerar a água fazendo bolhas em uma pipeta na taxa de 100 bolhas/minuto. Para minimizar a depleção de oxigênio é recomendado manter a água de diluição utilizada para preparação e renovação da solução-teste com máxima saturação. Excesso de aeração nos aquários causam turbulência na água, resultando em estresse físico nos organismos. Se a aeração for utilizada, deve ser detalhada no relatório do ensaio.

A dureza da água também é uma variável importante nos testes de toxicidade. A dureza pode ser definida pelo teor de íons de cálcio e magnésio e está correlacionada ao valor de pH. Pode influenciar significativamente a sensibilidade dos organismos-teste, aumentar a biodisponibilidade de alguns compostos, promover a dissolução de metais e assim, alterar a toxicidade (Knie e Lopes, 2004).

Os valores de dureza da água de diluição variam bastante entre os protocolos, sendo de 40 a 48 mg.L⁻¹ de CaCO₃ (ABNT, 2011), 10 a 250 mg.L⁻¹ CaCO₃ (OECD, 1992), 40 a 180 mg.L⁻¹ CaCO₃ (US EPA, 1996; 2002), e de até 300 mg.L⁻¹ CaCO₃ (ISO, 1996). Já o fotoperíodo deve ser ajustado de acordo com a espécie utilizada, mas geralmente varia entre 12 a 16 horas de luz diárias.

Em relação ao organismo teste, várias espécies são padronizadas para os testes de toxicidade aguda letal em peixes, a principal é *Danio rerio* (Cyprinidae), mas também são recomendadas as seguintes espécies: *Cyprinella leedsii* (Cyprinidae), *Cyprinus carpio* (Cyprinidae), *Gasterosteus aculeatus* (Gasterosteidae), *Ictalurus*

punctatus (Ictaluridae), *Lepomis macrochirus* (Centrarchidae), *Oncorhynchus kisutch* (Salmonidae), *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae), *Oryzias latipes* (Cyprinodontidae), *Pimephales promelas* (Cyprinidae), *Poecilia reticulata* (Poeciliidae), *Salmo salar* (Salmonidae) e *Salvelinus fontinalis* (Salmonidae).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 2002) alguns laboratórios utilizam espécies nativas para a realização dos testes de toxicidade que apresentam a mesma ou até maior sensibilidade que as espécies padronizadas. Mas eles recomendam a utilização dessas espécies nativas quando é proibida a importação das espécies exóticas ou quando existe regulamentação para seu uso e sugere-se a comparação da sensibilidade do organismo nativo em relação à resposta da espécie padronizada utilizando uma substância referência.

Para amostras de potencial tóxico desconhecido, sejam ambientais ou compostos químicos, é recomendável, antes do teste definitivo de toxicidade, a execução de um ensaio preliminar para conhecer o intervalo aproximado da sua ação nociva, ou seja, a maior diluição que causa morte a 100 % dos peixes, e a menor diluição na qual não se observa o efeito, esses valores-limite definem a diluição inicial, o intervalo entre as diluições e a diluição final da série de diluições do teste definitivo (Knie e Lopes, 2004).

O teste preliminar é executado do mesmo modo que o teste definitivo, porém o número de peixes, de diluições e o tempo de exposição são reduzidos. O objetivo desse procedimento é aumentar a eficiência do ensaio, racionalizando o gasto de tempo e material.

O ensaio definitivo é realizado através da exposição de peixes a pelo menos cinco concentrações do xenobiótico de interesse em série geométrica de diluição e um controle negativo, sendo todos os tratamentos em replicata. O número amostral varia de acordo com a espécie e o protocolo utilizado, mas em geral recomenda-se no mínimo sete peixes por replicata. A ABNT (2011) indica o número amostral mínimo de dez peixes para a espécie *Danio rerio* e vinte para a espécie *Pimephales promelas*, sendo que a densidade de estocagem não deve exceder 1,0 g.L⁻¹ e 0,4 g.L⁻¹ respectivamente. A densidade de estocagem é limitada para minimizar a depleção de oxigênio dissolvido, a acumulação de produtos metabólicos e/ou indução de estresse pela aglomeração ou qualquer outro fator que possa afetar os resultados (US EPA, 2002).

O ensaio pode ser realizado em sistema estático com duração de 48 horas, sendo recomendado para amostras que não causem depleção de oxigênio, amostras não voláteis e estáveis em meio aquoso. O teste também pode ser executado em sistema semiestático com renovação de 25% do volume da amostra a cada 24 horas, é recomendado para amostras que causem elevada depleção de oxigênio, voláteis e instáveis (ABNT, 2006). O sistema de fluxo contínuo também é adequado para amostras voláteis pois a solução teste é contínua e automaticamente renovada, este método é adequado para testes no local de amostragem, por exemplo, para análise de efluentes, no entanto, por requerer elevado volume de amostra (aproximadamente 400 L.dia⁻¹) é considerado muito custoso e difícil de ser conduzido fora do laboratório (US EPA, 2002). Nos sistemas semiestático e de fluxo contínuo o ensaio agudo tem duração de 96 horas.

As amostras podem ser preparadas com água natural de boa qualidade ou água encanada desde de que seja tratada, decolorada e filtrada, mas o mais indicado é a utilização de água reconstituída, preparada a partir da diluição de sais (cloreto de cálcio di-hidratado - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; sulfato de magnésio hepta-hidratado - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; bicarbonato de sódio - NaHCO_3 e cloreto de potássio - KCl) em água destilada ou deionizada. A água reconstituída é uma água sintética padronizada pelas normas dos testes de toxicidade, é uma solução de qualidade conhecida e altamente segura para o cultivo de organismos e para a execução dos testes.

Avaliação de letalidade é realizada a cada 24 horas e os peixes mortos devem ser retirados imediatamente à observação. Ao final do ensaio, registra-se o número total de indivíduos mortos em cada solução-teste. São considerados válidos os resultados nos quais ao término do período de ensaio, a porcentagem dos organismos mortos no controle for inferior ou igual a 10% e a sensibilidade à substância de referência estiver dentro da faixa estabelecida.

Para verificar a sensibilidade do organismo teste ou alterações no ambiente do sistema-teste, é realizado um teste de toxicidade com uma substância de potencial tóxico conhecido, como o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ou dodecil sulfato de sódio (DSS). A concentração letal mediana (CL_{50}) obtida deve estar compreendida num intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios obtidos para a mesma espécie.

Os resultados do teste são expressos como concentração letal mediana (CL_{50}) que pode ser definida como a concentração de uma substância capaz de causar efeito letal a 50% dos organismos. A CL_{50} é o parâmetro mais utilizado, mas também podem ser obtidas outras métricas como as apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros utilizados para expressão dos resultados do teste de toxicidade aguda letal em peixes.

Parâmetro	Definição	Obtenção	Expressão	Referência
CL ₅₀	Concentração letal mediana. Concentração da substância teste que causa morte de 50% de um lote de peixes em determinado período de exposição.	Métodos estatísticos para estimar o valor da CL ₅₀ : Spearman-Kärber, Trimmed Spearman-Kärber, Probit ou interpolação gráfica.	mg.L ⁻¹ ou % no caso de amostras ambientais ou efluentes.	OECD (1992).
CEzero	Concentração efetiva zero. Maior concentração da amostra onde não se observa efeito agudo nos organismos nas condições do ensaio.	Contagem direta dos organismos mortos na série de diluições-teste.	Número inteiro que corresponde ao fator de diluição (FD) da solução-teste.	ABNT (2011).
FT	Fator de toxicidade. Menor concentração da amostra na qual o número de organismos mortos foi menor ou igual a 10%.	Contagem direta dos organismos mortos na série de diluições-teste.	Número inteiro correspondente ao FD.	Knie e Lopes (2004).
CENO ou NOEC ³	Concentração de efeito não observado. Considerada a maior concentração da série de diluições que não causa efeito deletério nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste. Termo aplicado em testes agudos, subcrônicos ou crônicos e em testes com biomarcadores.	Em teste de letalidade aguda é a maior concentração que não induziu letalidade. Nos demais modelos de ensaio é obtido através de análise estatística, com comparação da resposta de todas as concentrações e o controle, sendo o CENO a maior concentração que não apresenta diferença significativa em relação ao controle.	mg.L ⁻¹ ou % no caso de amostras ambientais ou efluentes.	US EPA (1996; 2002), Jorgensen (2010).

(cont.)

³ Termo em inglês NOEC: no observable effects concentration.

LOEC ⁴	Menor concentração de efeito observado. Menor concentração testada em que foi observado letalidade ou outro endpoint em testes ecotoxicológicos.	Análise similar ao NOEC, no entanto o valor do LOEC corresponde a menor concentração que difere estatisticamente do controle, ou no caso de teste de toxicidade aguda letal é a menor concentração nominal que causou letalidade.	mg.L ⁻¹ ou amostras efluentes	% no caso de ambientais ou	Cooney (1995).
NOAEC ⁵	Concentração de efeito adverso não observado. Menor concentração em que a sobrevivência não seja estatisticamente diferente do controle. Aplicado para testes com múltiplas concentrações, uma única concentração ou análise qualitativa.	Análise estatística de teste de hipóteses.	mg.L ⁻¹ ou amostras efluentes.	% no caso de ambientais ou	US EPA (2002).
Tóxico/não tóxico	Classificação da amostra quando não existem diluições.	Análise estatística: teste de hipóteses e prova exata de Fisher.	Qualitativa		ABNT (2006).

Fonte: a autora.

⁴ Termo em inglês LOEC: lowest observable effect concentration.

⁵ Termo em inglês NOAEC: no observed adverse effect concentration.

2.4 BIOMARCADORES

O efeito letal de xenobióticos é uma avaliação de causa-efeito irreversível, já através da utilização de biomarcadores, podem ser determinados os efeitos subletais dos contaminantes em baixas doses ou concentrações, e assim ter uma avaliação de carácter preditivo e de alta relevância ecológica.

Os biomarcadores vêm sendo aplicados em vários tipos de organismos e permitem avaliar de forma sensível os efeitos subletais da exposição a agentes tóxicos, atuando na detecção de alterações em diferentes níveis de organização biológica, comumente utilizando indicadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos de exposição à xenobióticos (Huggett *et al.*, 1992) e podem ser categorizados como marcadores de exposição, efeito ou susceptibilidade (Kendall *et al.*, 2001).

Os biomarcadores são ferramentas de avaliação do efeito tóxico de substâncias que atuam em três níveis de complexidade (individual, celular e molecular) e são utilizados para a elucidação da relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco à saúde. Perturbações em funções subcelulares podem afetar o desempenho e a saúde dos organismos e ser traduzidos em efeitos nas populações e comunidades (Kendall, 2001).

Biomarcador é um indicador biológico que evidencia o efeito resultante de exposição a um estressor que pode ser interpretado como evento adaptativo não patogênico ou como séria alteração de um evento funcional, dependendo da toxicocinética e do mecanismo de ação do estressor (Decaprio, 1997).

Jha (2008) sugere que o estabelecimento de correlações entre diferentes biomarcadores são importantes quando há variabilidade de resposta entre espécies frente a um agente tóxico, como resultado de diferenças inter-específicas nas taxas de absorção, acumulação, metabolismo, excreção e eficiência de reparo de DNA. Desta forma, a adoção de múltiplos biomarcadores em uma variedade de espécies está sendo defendida para uma avaliação holística do impacto de poluentes nos ecossistemas.

2.4.1 Biomarcadores de genotoxicidade

Muitos contaminantes presentes nas águas superficiais não só põem em risco a sobrevivência e fisiologia dos organismos (Giesy e Hoke, 1989; Handy, 1994), mas também induzem alterações genéticas (Fabacher *et al.*, 1991) que podem levar a mutações e/ou carcinogênese (Folmar *et al.*, 1993). Desta forma, a genética ecotoxicológica definida como o estudo dos efeitos de componentes xenobióticos na estrutura e função do DNA e suas relações com efeitos ecológicos, visa avaliar o efeito de poluentes no material genético, seja através de efeitos mutagênicos, clastogênicos, teratogênicos e/ou aneugênicos (Kendall *et al.*, 2001).

A exposição a agentes genotóxicos é um dos problemas mais críticos relativo à proteção ambiental dos corpos d'água, principalmente pelos efeitos potenciais adversos. Substâncias genotóxicas causam danos no DNA e podem induzir mutações, reduzir a biodiversidade, aumentar o risco para desenvolvimento de câncer (Zegura *et al.*, 2009) e afetar as células germinativas, comprometendo a reprodução.

Genotoxicidade é o termo geral que se refere a alterações estruturais nos cromossomos (clastogenicidade) ou nas sequências de pares de bases do DNA (mutagenicidade) pela exposição a agentes tóxicos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). Os agentes que mudam a sequência do DNA são “tóxicos” para o gene e são, então, chamados de “genotóxicos”. Uma vez que as mutações são frequentemente associadas com o desenvolvimento de cânceres e defeitos ao nascimento, o conhecimento do potencial genotóxico de um agente químico industrializado ou naturalmente presente no ambiente é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco para a espécie humana (Ribeiro *et al.*, 2003).

A exposição de espécies aquáticas à substâncias e processos genotóxicos podem produzir efeitos como câncer (Baumann e Harshbarger, 1995; Baumann, 1998; Myers *et al.*, 1991; Vethak e ap Rheinallt, 1992), teratogênese e embriogênese (Mitchelmore e Chipman, 1998).

Em função da ampla implicação ecológica associada à genotoxicidade, a detecção e quantificação de danos genéticos são de grande interesse em estudos ambientais. O grau de integridade do DNA é considerado um sensível biomarcador para o monitoramento ambiental (Shugart, 1990).

2.4.1.1 Teste do micronúcleo

Os micronúcleos (MN) são formados em decorrência de danos induzidos nas células parentais, são fragmentos ou cromossomos inteiros não incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear é formada sendo observado um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula (Ribeiro *et al.*, 2003).

O teste do micronúcleo (MN) é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos (Hayashi *et al.*, 1994) e danos no fuso mitótico (Schmid, 1975). O teste do micronúcleo píceo foi desenvolvido por Hooftman e de Raat (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes, os autores sugerem o uso do teste com eritrócitos como uma alternativa ao teste de aberrações cromossômicas e ressaltam que a uniformidade das células do sangue periférico torna viável a contagem adicional de alterações morfológicas nucleares (AMN).

As AMN são classificadas em *blebbed*, *lobed*, *vacuolated*, *notched* (Carrasco *et al.*, 1990) e célula binucleada (Çavaş e Ergene-Gözükara, 2005). Essas anormalidades têm sido utilizadas como indicadores de danos cito-genotóxicos em peixes, embora os mecanismos de formação dessas anomalias nucleares não sejam bem compreendidos.

O teste do micronúcleo é um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica (Fenech, 2000). É evidente que micronúcleos podem somente ser expressos em células eucarióticas em divisão, ou seja, o ensaio não pode ser usado eficientemente ou quantitativamente em populações de células que não estejam em divisão ou em populações de células em divisão nas quais a cinética da divisão celular não seja bem conhecida ou controlada (Fenech, 2000).

Como a frequência de MN não pode ser observada antes da ocorrência do primeiro ciclo celular torna-se altamente dependente da cinética de proliferação celular. As taxas de proliferação celular provavelmente variam muito, dependendo da espécie de peixe, do tecido-alvo e das condições ambientais (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). Desta forma, não é possível estabelecer um rendimento ótimo de MN após exposição a agentes genotóxicos sem considerar a cinética celular envolvida.

O uso do teste do micronúcleo utilizando a coloração com Giemsa é o método mais utilizado em peixes, porém não possibilita a diferenciação entre eritrócitos jovens

e maduros. Essa distinção não é importante para avaliar o efeito crônico dos contaminantes, no entanto, observar apenas eritrócitos jovens proporciona um sistema de ensaio mais sensível, principalmente para avaliação de efeitos agudos, em função da cinética da formação dos micronúcleos (Ueda, 1992). Para a distinção de eritrócitos jovens e maduros é realizada a coloração das lâminas com laranja de acridina (Ueda, 1992).

As características básicas do teste com coloração de laranja de acridina são: (1) o efeito do agente químico é observado em eritrócitos imaturos; (2) o eritrócito imaturo tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente; (3) os micronúcleos são facilmente indentificáveis e a sua distribuição é bem definida; e (4) a frequência de micronúcleo induzida em eritrócito imaturo é dependente do tempo e da dose do agente tóxico (Ribeiro, 2003).

2.4.1.2 Ensaio cometa

O Ensaio cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula individualizada ou single-cell gel electrophoresis (SCG), é amplamente utilizado em estudos regulatórios e de biomonitoramento.

A técnica é realizada com a lise das membranas celulares e posterior corrida de eletroforese em meio alcalino. O DNA da célula que não apresentar dano não migrará ou migrará de forma homogênea formando um círculo. Caso o DNA apresente dano, serão formados fragmentos de diversos tamanhos, de modo que, na eletroforese, os fragmentos menores migram mais rapidamente em relação aos fragmentos maiores. Ocorrendo um dano intenso no material celular, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, originando a figura típica de um cometa (Olive *et al.*, 1990).

Para a interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em cabeça e cauda. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentam cauda, enquanto que as células com danos mais intensos apresentam caudas longas. Atualmente, o tamanho, intensidade da fluorescência, aspecto e outras características dos cometas são mensurados visualmente por microscopia ou por programas específicos de

análise de imagem. As medidas mais comumente utilizadas da migração dos fragmentos do DNA são extensão da cauda, momento da cauda e percentual de DNA na cauda (Figura 12).

O ensaio cometa realizado com a corrida de eletroforese sob condições alcalinas ($\text{pH} > 13$) permite a detecção de quebras de fita simples (quebras nas fitas e sítios incompletos de reparo por excisão) e duplas, de sítios álcali-lábeis e sítios de reparo incompleto, ligações cruzadas e sítios abásicos (Singh *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 1989; Olive *et al.*, 1990; Tice *et al.*, 2000; Kumaravel e Jha, 2006; Kumaravel *et al.*, 2007).

Substâncias genotóxicas produzem modificações químicas ou físicas no DNA, como quebras nas fitas de DNA (Akcha *et al.*, 2004). Estas quebras são as primeiras e mais comuns consequências da exposição a agentes genotóxicos (Gontijo e Tice, 2003). Deste modo, a observação de quebras nas fitas de DNA pode fornecer informações sobre a formação de lesões no DNA por si só, bem como a dinâmica associada com a manutenção da integridade genômica, visto que quebras das fitas fazem parte do processo de reparo do DNA por excisão de pares de bases (Nacci *et al.*, 1996).

O ensaio cometa tem sido aplicado com sucesso a uma série de grupos filogeneticamente distintos, utilizando grande variedade de agentes físicos e químicos, com os organismos em diferentes fases de desenvolvimento e vários tipos celulares (Jha, 2008).

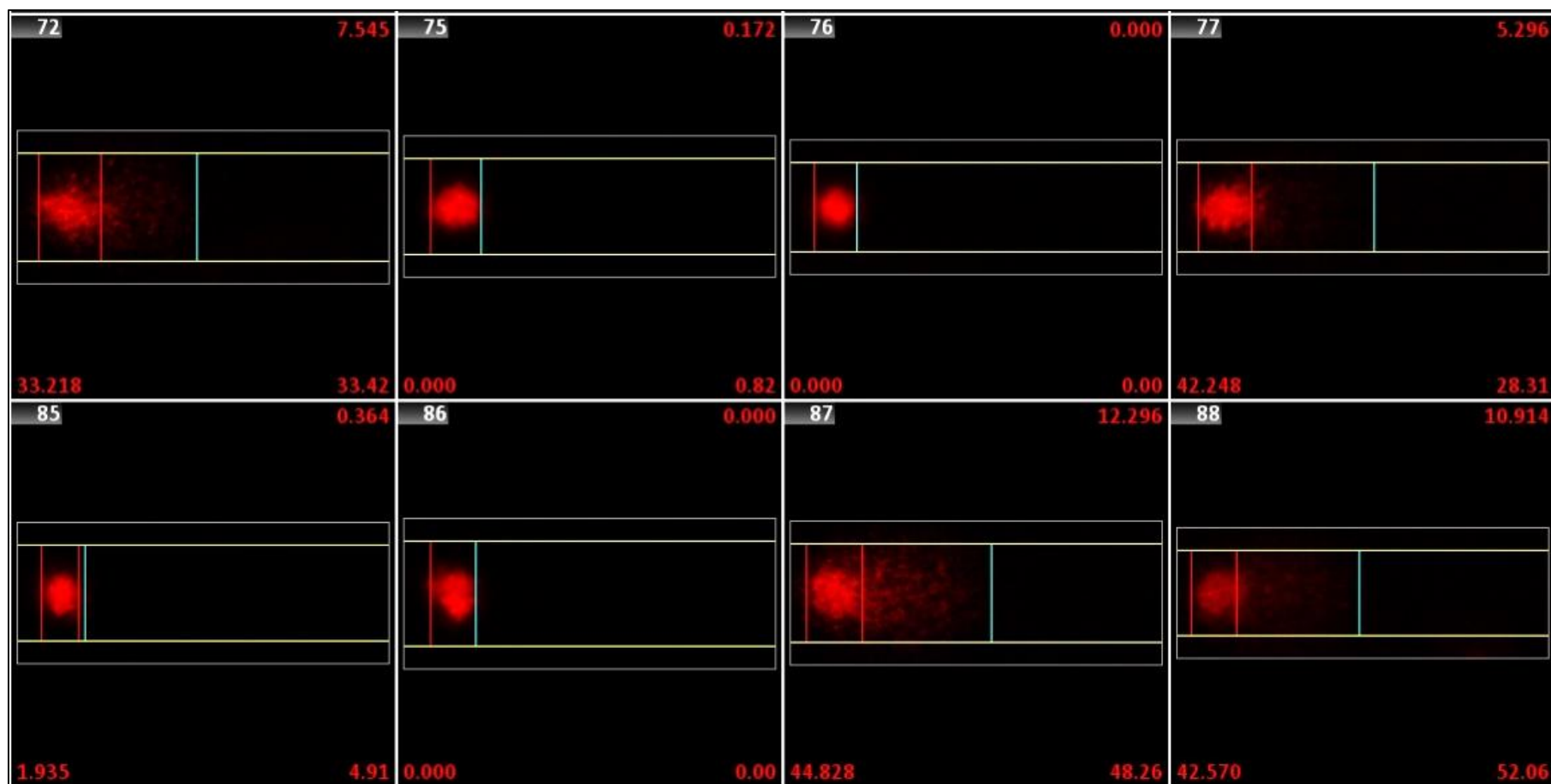


Figura 12. Análise automatizada do ensaio cometa utilizando microscópio de fluorescência Zeiss, com câmera CCD monocromática, objetiva de 20X, programa Metafer 4 – Comet Scan – Metasystems. Região da cabeça delimitada entre as linhas vermelhas e final da cauda marcado pela linha azul. Valor no quadrante superior esquerdo indica o número do nucleóide capturado na lâmina; valor superior direito representa o momento da cauda; valor inferior esquerdo indica o comprimento de cauda (μm) e o número inferior direito indica o % de DNA na cauda do cometa. Fonte: a autora.

2.4.1.3 Sistema *Allium cepa*

Plantas superiores, como *Allium cepa*, são consideradas excelentes bioindicadoras de efeitos genotóxicos e mutagênicos (Grant, 1999). O sistema de teste *Allium cepa* (Figura 13), é um ensaio de toxicidade que apresenta diversas vantagens, é rápido, de baixo custo, possibilita uma boa preparação dos cromossomos para análise de danos e distúrbios na divisão celular, permite a identificação de mutágenos e pro-mutágenos e apresenta boa correlação com outros sistemas de teste (Fiskesjö, 1985).

As células meristemáticas das raízes de plantas são indicadores apropriados para a detecção de agentes clastogênicos, aneugênicos e mutagênicos, amplamente utilizadas no monitoramento de água e solos contaminados, assim como na análise de substâncias específicas (Ma *et al.*, 1995; Leme e Marin-Morales, 2009).

Vários danos pontuais podem ser analisados como aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleos, sendo a análise de MN a mais frequente por ser um indicador simples e efetivo de danos no DNA (Abdel Migid *et al.*, 2007). Além de efeitos genotóxicos o teste com *A. cepa* permite a avaliação de citotoxicidade através da análise do índice mitótico e da frequência de anomalias nucleares nas células interfásicas.



Figura 13. Sistema teste *Allium cepa*. Exposição ao contaminante, germinação das sementes e visualização das células sob microscopia de luz. Fonte: a autora.

2.4.2 Biomarcadores de citotoxicidade

2.4.2.1 Ensaio de difusão do DNA

O ensaio de difusão do DNA permite a identificação de células viáveis, em necrose e apoptose, baseado na análise da fragmentação do DNA (Gichner *et al.*, 2005).

Quando os danos no DNA são induzidos pela exposição a agentes químicos, a capacidade de reparo pode ser oprimida e como consequência da progressão da condição de estresse, processos de apoptose podem ser desencadeados (Steinert, 1996). Apoptose é um caminho geneticamente regulado de morte celular programada em animais e plantas e desempenha um papel importante na diferenciação tecidual e pode ocorrer em resposta à lesão celular, como exposição a agentes tóxicos. Em contraste, a necrose representa a morte celular não-programada (Havel e Durzan, 1999; Krishnamurthy *et al.*, 2000). Apoptose pode ser induzida por leve estímulo genotóxico, se o estímulo for aumentado, a célula pode morrer por necrose, visto que, intensa pressão genotóxica danifica proteínas e outras macromoléculas celulares, necessárias à apoptose (Singh, 2005).

O ensaio de difusão do DNA, desenvolvido por Singh (2000) em linfócitos humanos, é uma versão modificada do ensaio cometa, é um método simples, sensível e confiável para quantificar morte celular (Singh, 2005). O processamento das amostras procede similarmente à técnica do ensaio cometa, no entanto, as células não são submetidas à eletroforese. No ensaio de difusão, fragmentos de DNA de baixo peso molecular, que podem não ser detectados pelo ensaio cometa (Frenzilli, 2004) espalham-se de forma difusa em todas as direções da agarose, e os nucleóides necróticos e apoptóticos podem ser diferenciados de acordo com sua estrutura (Gichner, 2005).

Os nucleóides de células apoptóticas são caracterizados no ensaio de difusão pela alta dispersão de DNA (três vezes o diâmetro médio do núcleo), tem contorno indefinido ou nebuloso, sem devido limite do tamanho nucleossomal. Os nucleóides das células necróticas são maiores e pouco definidos, e apresentam limite externo do DNA com aparência relativamente homogênea e definida (Singh, 2000) (Figura 14).

O método baseia-se no fato de que células apoptóticas apresentam vários sítios alcali-lábeis (MacManus *et al.*, 2000), que mostram fragmentos de DNA quando expostos sob condições alcalinas. Esses fragmentos podem ser facilmente analisados, pois apresentam aparência de halo com pouca definição (Singh, 2000).

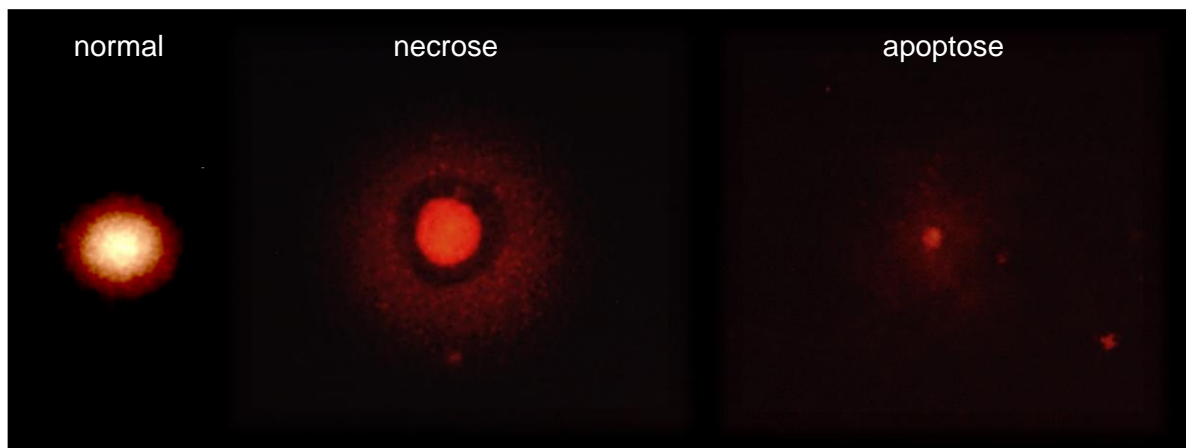


Figura 14. Nucleóides do ensaio de difusão do DNA. Aumento 400x. Fonte: a autora.

2.4.2.2 Citotoxicidade eritropoiética

A avaliação da citotoxicidade eritropoiética é um componente-chave da avaliação de segurança para o desenvolvimento de novas drogas, realizado através da contagem de eritrócitos imaturos no sangue periférico que é o mais popular e conveniente método de monitoramento da eritropoiese (Figura 15). Decréscimos na proporção de eritrócitos imaturos em relação à maturos são considerados como indicadores de citotoxicidade induzida (Schmid, 1975; Suzuki *et al.*, 1989).

Em estudos ecotoxicológicos com peixes é indicada a análise da frequência de eritrócitos imaturos em associação à análise de MN, pois diversos agentes genotóxicos, podem sob certas condições, apresentar propriedades citotóxicas, resultando na inibição da eritropoiese. Nestas condições não são formados eritrócitos normais nem micronucleados, e a associação desses biomarcadores torna-se essencial para evitar resultados falso negativos (Udroiu, 2006).

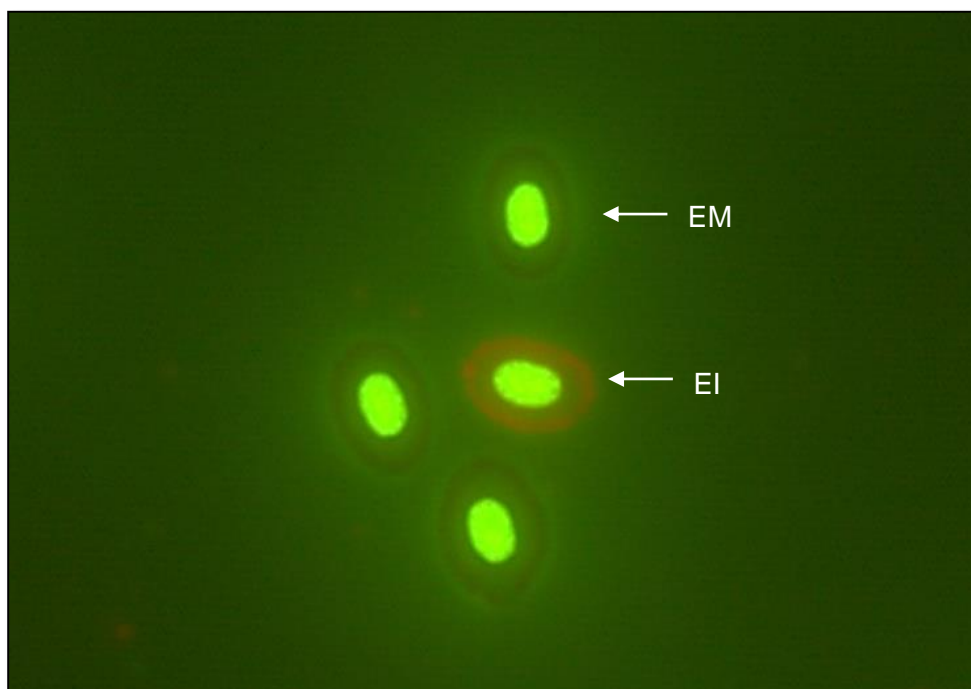


Figura 15. Eritrócitos maduros (EM) e imaturos (EI) de *Astyanax altiparanae*. Fonte: a autora.

2.4.3 Análise de HPAs na bile

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) podem ser acumulados na vesícula biliar dos peixes antes de serem excretadas. Desta forma, a determinação de HPAs ou seus metabólitos na bile é um indicativo da biodisponibilidade desses compostos.

Os hidrocarbonetos aromáticos solubilizados na água são captados pelos peixes através das brânquias, transportados pelo sangue arterial para todo o corpo, retornam para o coração, passam pelos órgãos constituintes do sistema urinário e hepatobiliar onde alguns compostos são biotransformados para formas mais hidrofílicas e excretados via urina (Valdez Domingos *et al.*, 2011). As formas não conjugadas (lipofílicas) são excretadas nas fezes. Metabólitos eliminados pela bile podem ser reabsorvidos pelo intestino voltando para corrente sanguínea (Jandacek e Tso, 2001).

Nestes processos de captação, metabolização, excreção e reabsorção os HPAs ou seus metabólitos podem ser distribuídos e acumulados em diversos órgãos e tecidos (Spacie *et al.*, 1983; Valdez Domingos *et al.*, 2011).

Os metabólitos de HPAs biliares em peixes podem ser mensurados através de vários métodos, como ensaios de fluorescência simples; cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência; cromatografia gasosa com espectrometria de massa entre outros. A concentração de HPAs na bile são biomarcadores de exposição aguda e permitem avaliar se os organismos foram expostos a esses compostos no ambiente sem necessitar das análises da água (Beyer *et al.*, 2010).



Figura 16. Vesícula biliar de *Astyanax altiparanae*.
Fonte: a autora.

REFERÊNCIAS

Abdel Migid HM, Azab YA, Ibrahim WM (2007) Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicol Environ Saf* 66:57–64.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas (2011) Aquatic ecotoxicology, acute toxicity, test with fish (NBR 15088), 22p.

Aina R, Palin L, Citterio S (2006) Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L.. *Chemosphere* 65:666–673.

Akcha F, Leday G, Pfohl-Leszkowicz A (2004) Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutat Res* 552:197-207.

Alcaraz G (2000) Relevant stress indices in aquatic ecotoxicology. *Rev Int Contam Ambie* 16:75-81.

Almeida EA, Oliveira Ribeiro CA (2003) Pollution and fish health in tropical ecosystems. 1st ed., CRC Press, New York, 402 p.

Al-Sabti K, Metcalfe CD (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 343:121–35.

Anjos NA, Schulze T, Brack W, Val AL, Schirmer K, Scholz S (2011) Identification and evaluation of cyp1a transcript expression in fish as molecular biomarker for petroleum contamination in tropical fresh water ecosystems. *Aquat Toxicol* 103:46–52.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (2013) Evolução do mercado de combustíveis e derivados: 2000-2012, 26p.

ARMA, The Asphalt Roofing Manufacturers Association (2011) The bitumen roofing industry– a global perspective: production, use, properties, specification and occupational exposure. 2nd ed., Lexington, Kentucky, USA, 78p.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2007) E729 – 96 Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians.

Badham HJ, Winn LM (2007) Investigating the role of the aryl hydrocarbon receptor in benzene-initiated toxicity in vitro. *Toxicology* 229:177–185.

Baumann PC (1998) Epizootics of cancer in fish associated with genotoxins in sediment and water. *Mutat Res* 411:227–233.

Baumann PC, Harshbarger JC (1995) Decline in liver neoplasms in wild brown bullhead catfish after coking plant closes and environmental PAHs plummet. *Environ Health Perspect* 103:168–170.

Bertoletti E (2000) Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces: Cyprinidae). 117 f. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental). Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.

Beyer J, Jonsson G, Porte C, Krahm MM, Ariese F (2010) Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 30:224–44.

Brouwer A, Murk AJ, Koeman JH (1990) Biochemical and physiological approaches in ecotoxicology. *Functional Ecology* 4:275-281.

Carrasco KR, Tylbury KL, Myers MS (1990) Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci* 47:2123-2136.

Çavaş T, Ergene-Gözükara S (2005) Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ Mol Mutagen* 46:64–70.

Chang JI, Lin CC (2006) A study of storage tank accidents. *J Loss Prevent Proc* 19:51-59.

CONAMA, Conselho Nacional de Meio Ambiente. Classificação dos corpos de água, resolução 357 de 2005.

Connell DW, Lam P, Richardson B, Wu R (1999) Introduction to Ecotoxicology. Wiley-Blackwell, 170p.

Connon RE, Geist J, Werner I (2012) Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors (Basel)* 12:12741–71.

CONSEMA, Conselho Estadual do Meio Ambiente. Resolução n^o 129, de novembro de 2006 - Critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes Líquidos lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul.

Cooney JD (1995) Freshwater tests. In: Rand GM (Ed.) *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. CRC, 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, pp.71-102.

Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espindola ELG (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim Nova* 31:1820–1830.

Dean BJ (1978) Genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutat Res* 47:75–97.

Decaprio AP (1997) Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment. *Environ Sci Technol* 31:1837-1848.

Desai SR, Verlecar XN, Ansari ZA, Jagtap TG, Sarkar A, Vashistha D, Dalal SG (2010) Evaluation of genotoxic responses of *Chaetoceros tenuissimus* and *Skeletonema costatum* to water accommodated fraction of petroleum hydrocarbons as biomarker of exposure. *Water Res* 44:2235-2244.

Di Giulio RT, Hinton DE (2008) *The toxicology of fishes*. CRC Press, 1096 p.

Diário do presal. <http://diariodopresal.wordpress.com/o-que-e-o-pre-sal/torre-de-fracionamento-de-petroleo-2/>. Acessado em 18 de setembro de 2014.

Elliott J, Bishop C, Morrissey C (2011) *Wildlife Ecotoxicology: Forensic approaches*. Series: Emerging Topics in Ecotoxicology, v.4, Hardcover.

Fabacher DL, Besser JM, Schmitt CJ, Harahbargar JC, Peterman PH, Lebo JA (1991) Contaminated sediments from tributaries of the Great Lakes: chemical characterization and carcinogenic effects in Medaka (*Oryzias latipes*). *Arch Environ Contam Toxicol* 20:17-34.

Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455:81-95.

Fiskesjö G (1985) The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102:99-112

Folmar LC, Gardner GR, Hickey J, Bonomelli S, Moody T (1993) Serum chemistry and histopathological evaluations of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from Buffalo and Niagara Rivers, New York. *Arch Environ Contam Toxicol* 25:298-303.

Frenzilli G, Scarcelli V, Del Barga I, Nigro M, Förlin L, Bolognesi C, Sturve J (2004) DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutat Res* 552:187-195.

Gichner T, Mukherjee A, Wagner ED, Plewa MJ (2005) Evaluation of the nuclear DNA Diffusion Assay to detect apoptosis and necrosis. *Mutat Res* 586:38-46.

Giesy JP, Hoke RA (1989) Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J Great Lakes Res* 15:539-569.

Goldstein EG (1988) Testes de toxicidade de efluentes industriais. *Revista Ambiente* 2:33-38.

Gontijo AMMC, Tice R (2003) Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques E K (Org.) *Mutagenese Ambiental*. Canoas: Ulbra, pp. 173-200.

Grant WF (1999) Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutation - a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat Res* 426:107-112.

Gravato C, Santos MA (2002) Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocyte genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotoxicol Environ Saf* 5:115–27.

Handy RD (1994) Intermittent exposure to aquatic pollutants: assessment, toxicity and sublethal responses in fish and invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 107:171-184.

Harvey RG (1997) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Wiley, New York. In: Beyera J, Jonsson G, Porte C, Krahn MM, Ariese F (2010) Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. *Environ Toxicol Phar* 30:224–244.

Havel L, Durzan DJ (1988) Programmed cell death in plant development. In: Strnad M, Heit M, Tan YL, Miller KM, The origin and deposition history of polycyclic aromatic hydrocarbons in the finger lakes region of New York USA. *Water Air Soil Pollut* 37:85-110.

Hayashi M Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, Ileson FB, Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H, Sutou S, Vannier B (1994) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 312:293-304, 1994.

Heinberg R (2007) The party's over: oil, war and the fate of industrial societies. Clairview books, 306 p.

Hoffman DJ, Ratter BA, Burton GA Jr., Cairns J Jr. (1995) Handbook of ecotoxicology. Boca Raton, FL: Lewis CRC.

Hsu CS, Robinson P (2007) Practical advances in petroleum processing, v.1, Springer Science & Business Media, 910 p.

Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM Jr, Bergman HL (1992) Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histopathological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis, Boca Raton, 347p.

Incardona JP, Collier TK, Scholz NL (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 196:191– 205.

Ingole B, Sivadas S, Goltekar R, Clemente S, Nanajkar M, Sawant R, D'silva C, Sarkar A, Ansari Z (2006) Ecotoxicological effect of grounded MV River Princess on the intertidal benthic organisms off Goa. *Environ Internat* 32:284-291.

ISO, International Organization for Standardization (1996) ISO 7346- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)], Part 1: Static method, Part 2: Semi-static method, Part 3: Flow-through method.

Jandacek RJ, Tso P (2001) Factors affecting the storage and excretion of toxic lipophilic xenobiotics. *Lipids* 36:1289–1305.

Jha AN (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23:207-221.

Jorgensen E (2010) *Ecotoxicology*. Academic Press, 402 p.

Jorgensen SE (2010) *Ecotoxicology*. Academic Press, Amsterdam, 402p.

Jurado E, Serrano MF, Olea JN, Lechuga M, Jiménez JL, Ríos F (2012) Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and microalgae: a comparative study. *Bull Environ Contam Toxicol* 88:290–295.

Katsumiti A, Valdez Domingos FX, Azevedo M, da Silva MD, Damian RC, Almeida MIM, Silva de Assis HC, Cestari MM, Randi MAF, Oliveira Ribeiro CA, Freire CA (2008) An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña oil spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environ Monit Assess* 152:209–222.

Kendall RJ (1992) Farming with agrochemicals: the response of wildlife. *Environ Sci Technol* 26:238-245.

Kendall RJ, Anderso TA, Baker RJ, Bens CM, Carr JA, Chiodo LA, Cobb III GP, Dickerson RL, Dixon KR, Frame LT, Hooper MJ, Martin CF, Mcmurry ST, Patino R, Smith EE, Theodorakis CW (2001) *Ecotoxicology*. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 6th ed., Klaassen CD (Ed.) McGraw-Hill, 1236p.

Kendall RJ, Lacher TE Jr. (1994) *Wildlife toxicology and population modeling: integrated studies of agroecosystems*. Taylor & Francis, 576p.

Kennish MJ (1992) *Ecology of estuaries: anthropogenic effects*. CRC Press, Boca Raton, 450p.

Knie JLW, Lopes EWB (2004) *Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações*. Florianópolis: FATMA/GTZ, 289p.

Krishnamurthy KV, Krishnaraj R, Chozhavendan R, Christopher FS (2000) The programme of cell death in plant and animals: a comparison. *Current Sci* 79:1169–1181.

Kumaravel TS, Jha AN (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res* 605:7–16.

Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha NA (2007) Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25:53-64.

Leme DM, Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res* 682:71–81.

Ma TH, Xu Z, Xu C, McConnell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang H (1995) The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res* 334:185–195.

MacManus JP, Rasquinha I, Walker T, Chakravarthy B (2000) Apoptotic human SH-SY5Y neuroblastoma cells have regularly spaced single strand DNA breaks and increased DNA-dependent protein kinase activity. *Human Cell* 9:197–204.

Matsumoto FE, Cólus IMS (2000) Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genet Mol Biol* 492:489–492.

Meniconi MFG, Gabardo IT, Carneiro MER, Barbanti SM, Silva GC, Masone CG (2002) Brazilian oil spills chemical characterization – case studies. *Environ Forensics* 3:303–321.

Metcalf & Eddy, Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD (2003). *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*, 4th ed., McGraw-Hill, New York, 1819p.

Mitchelmore CL, Chipman JK (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res* 399:135–147.

MME, Ministério de Minas e Energia (2009) *Resenha Energética Brasileira*. 22p.

Moiana-Costa P, Galvan GL, Ferrar MVM, Vicari MR, Cestari MM (2010) Genotoxicidade em *Rhamdia quelen* na contaminação subcrônica via trófica do sulfato de cobre em duas concentrações. In: XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Bombinhas.

Moriarty F (1999) *Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems*. Academic Press, 3rd ed., 347p.

Myers MS, Landahl JT, Krahn MM, McCain BB (1991) Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast. *Environ Health Persp* 90:17–26.

Nacci DE, Cayula S, Jackim E (1996) Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicol* 35:197–210.

National Research Council (2003) *Oil in the sea III: inputs, fates, and effects*. National Academies Press, Washington, 280p.

Newman MC, Unger MA (2002) *Fundamentals of Ecotoxicology*, 2nd ed., CRC Press, 480p.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development (1995) *International Energy Agency, Energy Balances of OECD Countries 1992 1993*. OECD, Paris.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development (1992) *Guideline for testing of chemicals. Fish, acute toxicity test, Part 203*, 9p.

Olive PL, Banáth JP (2006) The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 1:23–29.

Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the comet assay. *Radiat Res* 122:86-94.

Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, Mariguela TC, Benine RC, Ortí G, Vari RP, Castro RMC (2011) Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evol Biol* 11:275.

Oliveira-Martins CR, Grisolia CK (2009) Toxicity and genotoxicity of wastewater from gasoline stations. *Genet Mol Biol* 32:853–856.

Osório FHT, Silva LFO, Piancini LDS, Azevedo ACB, Liebel S, Yamamoto FY, Philippi VP, Oliveira MLS, Ortolani-Machado CF, Neto FF, Cestari MM, Silva de Assis HC, Oliveira Ribeiro CA (2013) Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environ Sci Pollut Res* 21:9145-9160.

Ostrander GK (2000) *The laboratory fish*. Elsevier, 678 p.

Pacheco M, Santos M (2001) Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 49:64–75.

Pamplona JH, Oba ET, Silva TA, Ramos LP, Ramsdorf WA, Cestari MM, Oliveira Ribeiro CA, Zampronio AR, Silva de Assis HC (2011) Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Ecotox Environ Saf* 74:342–349.

Pedrozo MFM, Barbosa EM, Corseuil HX, Schneider MR, Linhares MM (2002) *Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo*. 1st ed., NEAMA, Salvador.

Queiroz SCN, Ferracini VL, Souza DRC (2009) Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo. *Embrapa Meio Ambiente: Documentos* 79. Jaguariúna, SP.

Radovic LR (1997) Petroleum. In: *Energy and Fuels in Society: Analysis of Bills and Media Reports*. McGraw-Hill College Custom Series pp.137–168.

Radovic LR, Schobert HH (1992) *Energy and fuels in society*. College custom series. McGraw-Hill, 422 p.

Rand GM, Wells PG, McCarty LS (1995) Introduction to aquatic toxicology. In: Rand GM (Ed.) *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*. 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, pp.3-66.

Reddy CM, Eglinton TI, Hounshell A, White HK, Xu L, Gaines RB, Frysiner GS (2002) The West Falmouth oil spill after thirty years: the persistence of petroleum hydrocarbons in marsh sediments. *Environ Sci Technol* 36:4754-4760.

Ribeiro LR (2003) Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK Mutagênese Ambiental. Canoas: Ulbra, p. 173-200.

Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA (2010) Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci Total Environ* 408:2054–2059.

Schmid W (1975) The micronucleus test. *Mut Res* 31:9-15.

Shugart LR (1990) Biological monitoring: testing for genotoxicity. In: McCarthy JF, Shugart LR (Eds.) *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 217-227.

Silva RRP, Pires OR, Grisolia CK (2010) Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. *Genet Mol Biol* 33:750–755.

Singh NP (2000) A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 256:328–337.

Singh NP (2005) Apoptosis Assessment by the DNA Diffusion Assay. *Methods Mol Med* 111:55-67.

Singh NP, Dannera DB, Tice RR, McCoya MT, Collins GD, Schneider EL (1989) Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res* 184:461-470.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.

Smith MR (1990) The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* 1:191–206.

Spacie A, Landrum PF, Leversee GJ (1983) Uptake, depuration, and biotransformation of anthracene benzo[a]pyrene in Bluegill Sunfish. *Ecotoxicol Environ Saf* 341:330–341.
Speight JG (1997) *Petroleum chemistry and refining*. CRC Press, 350 p.

Steinert SA (1996) Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Mar Environ Res* 42:253–259.

Sunday AA, Matthew O, Olukayode OA, Olakunle DT, Olatope SO (2007) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. *World J Microb Biot* 23:1149-1159.

Suzuki Y, Nagae Y, Li J, Sabaka H, Mazowa K, Takahashi A, Shimuzu H (1989) The micronucleus test and erythropoiesis: effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (*P/N* ratio). *Mutagenesis* 4:420-424.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.

Truhaut R (1977) Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf* 1:151-173.

Udroiu I (2006) The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat Toxicol* 79:201–4.

Ueda T, Hayashi M, Koide N, Sofuni T, Kobayashi J (1992) A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Sci Technol* 25-235-240.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (1996) Ecological effects test guidelines. Fish acute toxicity test, freshwater and marine, 11p.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (2002) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5th ed., 266p.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (2003) Environmental technology verification report: strategic diagnostics Inc. Microtox® rapid toxicity testing system. Battelle, Ohio, 39p.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (2007) Clean Water Act., Boston.

Valdez Domingos FX, Oliveira Ribeiro CA., Pelletier É, Rouleau C (2011) Tissue distribution and depuration kinetics of waterborne ¹⁴C-labeled light PAHs in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ Sci Technol* 45:2684–2690.

Vanzella TP, Martinez CBR, Cólus IMS (2007) Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat Res* 631:36–43.

Verlecar XN, Desai SR, Sarkar A, Dalal SG (2006) Biological indicators in relation to coastal pollution along Karnataka coast. *Water Res* 40:3304–3312.

Vethak AD, ap Rheinallt T (1992) Fish disease as a monitor for marine pollution: the case of the North Sea. *Rev Fish Biol Fisher* 2:1-32.

Vicari T (2012) Avaliação genotóxica em *Hoplias lacerdae* (Erythrinidae) após exposição à nanopartícula de dióxido de titânio (TiO₂) e chumbo inorgânico Pb(II).

Projeto de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná/UFPR.

Vicari T, Ferraro MVM, Ramsdorf WA, Mela M, Oliveira Ribeiro CA, Cestari MM (2012) Genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH_3Hg^+) in *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 82:47–55.

Walker CH, Sibly RM, Hopkin SP, Peakall DB (2005) Principles of ecotoxicology. 3rd ed., CRC Press, 344p.

Waller WT, Allen HJ (2010) Acute and chronic toxicity. In: Jorgensen E (Ed.) *Ecotoxicology*. Academic Press, pp. 59-70.

Weelink SAB, van Eekert MHA, Stams AJM (2010) Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. *Rev Environ Sci Bio/Technol* 9:359–385.

Winteringham FPW (1977) Comparative ecotoxicology of halogenated hydrocarbon residues. *Ecotoxicol Environ Saf* 1:407-425.

Woodle RA, Chandler Jr. WB (1952) Mechanism of occurrence of metals in petroleum distillates. *J Ind Eng Chem* 44:2591-2596.

Zagatto PA, Bertoletti E, Goldstein EG, Souza HB (1992) Avaliação de toxicidade em sistema de tratamento biológico de afluentes líquidos. *Revista SABESP* 166:1-6.

Zegura B, Heath E, Cernosa A, Filipic M (2009) Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere* 75:1453-1460.

Zhang JF, Sen H, Xu TL, Wang XR, Li WM, Gu YF (2003) Effects of long term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. *Bull Environ Contam Toxicol* 71:234-239.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo (FSP) e da gasolina (FSG) em diferentes organismos e níveis de organização biológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as características físico-químicas do petróleo cru e da gasolina e relacionar com suas implicações ambientais;
- Determinar a Concentração Letal Mediana (CL₅₀) da FSP e da FSG em *Astyanax altiparanae*, *Astyanax serratus* e *Danio rerio*;
- Comparar a sensibilidade de resposta ao teste de letalidade aguda entre a espécie nativa *A. altiparanae* e a espécie padronizada *D. rerio*;
- Estimar a Concentração de Efeito Tóxico Mediano (CE₅₀) da FSP em *Vibrio fischeri*;
- Avaliar os efeitos tóxicos subletais da FSP e da FSG em peixes após períodos de exposição aguda; subcrônica e de depuração através de biomarcadores hematológicos e de cito-genotoxicidade;
- Quantificar os metabólitos de hidrocarbonetos aromáticos na bile dos peixes e relacionar às concentrações desses compostos na água e com os efeitos observados através dos biomarcadores;

- Verificar se os efeitos induzidos pelos xenobióticos nos peixes são passíveis de reversão após períodos de depuração;
- Avaliar os efeitos cito-genotóxicos da FSP e da FSG em *Allium cepa*.
- Relacionar às concentrações de hidrocarbonetos aromáticos da fração solúvel do petróleo (FSP) e da gasolina (FSG) aos efeitos ecotoxicológicos.

CAPÍTULO 1

Petróleo e gasolina: características físico-químicas e implicações ambientais.

Resumo

O petróleo é um produto essencial para a sociedade o que o torna muito valorizado economicamente. No entanto, a ampla utilização de petróleo gera uma contínua e expressiva contaminação dos ambientes aquáticos, sendo preocupante não apenas pelo volume lançado, mas também pela toxicidade de seus constituintes. Neste trabalho, foram caracterizadas amostras de petróleo e gasolina nacionais, a fim de relacionar a composição desses produtos com as suas implicações em situações de contaminação ambiental e discutir os aspectos econômicos que influenciam essas características através da reformulação e tratamento desses produtos. Dentre as características analisadas, vale destacar que o petróleo apresentou densidade de 26,4 °API, indicando uma capacidade intermediária de flutuação, solubilização e emulsificação na água e elevada acidez conferida aos ácidos naftênicos, que são tóxicos aos organismos aquáticos. As características da gasolina analisada encontraram-se em conformidade com a legislação, exceto as concentrações de etanol e enxofre, que excederam os limites internacionais, e são considerados compostos tóxicos. A caracterização do petróleo e derivados é essencial para determinar seu comportamento ambiental, sendo uma ferramenta imprescindível para o manejo de áreas impactadas e para a avaliação dos efeitos nos organismos afetados.

Palavras-chave: °API; pressão de vapor, HPAs, BTEX.

Introdução

O petróleo e seus destilados são formados por misturas complexas contendo centenas de substâncias químicas. Os principais constituintes podem ser divididos em cinco grupos principais. 1-naftenos (cicloparafinas e cicloalcanos); 2-parafinas (alcanos simples); 3-iso-parafinas (iso-alcanos); 4-aromáticos (mono e policíclicos aromáticos) e 5-compostos com nitrogênio, enxofre e oxigênio (Farrell-Jones, 2003). Petróleos de diferentes origens, assim como seus destilados variam na proporção desses compostos e assim apresentam diferentes propriedades. Vários desses compostos são tóxicos, apresentam mobilidade e persistência ambiental, sendo alterados ao longo do tempo após o lançamento no ambiente (Farrell-Jones, 2003).

A contaminação do ambiente aquático por petróleo e destilados ocorre frequentemente, através de acidentes desde a extração, transporte, refino, descarga de efluentes industriais e municipais e infiltrações de tanques de armazenamento de combustíveis (Kennish, 1992; Pacheco e Santos, 2001; Tiburtius *et al.*, 2004; Cantagallo *et al.*, 2007). A magnitude dos impactos ambientais vai depender muito do tipo de petróleo ou produto destilado, pois existe muita distinção de tamanho, composição e proporção entre seus constituintes.

Esses eventos de contaminação causam danos severos nos organismos aquáticos como resultado de processos físicos, como sufocamento, até efeitos tóxicos letais e subletais. A severidade do impacto depende da quantidade, tipo de petróleo ou destilado, das condições ambientais e da sensibilidade dos organismos e dos habitats afetados pelo contaminante. Esses danos ambientais podem levar à perda de biodiversidade, danos econômicos na aquicultura, turismo e recreação e exposição humana aos compostos tóxicos através de alimentos e água contaminada (ITOPF, 2011abc).

Considerando que a dinâmica e o impacto ambiental gerados pela contaminação por petróleo e destilados sejam influenciados pela composição destes xenobióticos, este trabalho objetivou discutir sobre as características físico-químicas e as implicações ambientais de uma amostra de petróleo cru e de gasolina nacional.

Material e Métodos

O petróleo cru (CAS 8002-05-9) foi fornecido e analisado pela Petrobrás S.A., Refinaria Presidente Getúlio Vargas, RJ, Brasil. A amostra foi caracterizada quanto a concentração de água e sedimentos (ASTM, 2011); densidade relativa e densidade API (American Petroleum Institute) (ASTM, 2012a); teor de sal (ASTM, 2010), acidez (NTP, 1995) e concentração de gás sulfídrico (H_2S) (NTP, 2014).

As amostras de gasolina (CAS 8006-61-9) foram coletadas em frascos âmbar de 1 litro (ASTM, 2001a) em diferentes postos de gasolina do estado do Paraná, Brasil. Posteriormente foram homogeneizadas e analisadas pelo Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos (LACAUT) da Universidade Federal do Paraná. Foram analisadas as seguintes características da gasolina: pressão de vapor à 37,8°C (ASTM, 2001b); destilação (ASTM, 2001c); massa específica à 20°C (ASTM, 2001d); teor de etanol anidro combustível (ABNT, 2008); octanagem MON - Motor Octane Number, octanagem RON - Research octane number, Índice antidetonante - IAD, éter metil-terc-butílico (ETBE), metil tert-butil éter (MTBE), metanol, etanol, hidrocarbonetos saturados, insaturados e aromáticos (PEA 03 Rev. 06); benzeno (ASTM, 2012b); cor (método visual); aspecto (ABNT, 2011); enxofre total (ASTM, 2010b); massa de carbono, oxigênio e hidrogênio (PEA 21 Rev.04) e poder calorífico inferior (PEA 47).

Resultados e discussão

A caracterização do petróleo está apresentada na tabela 1. A amostra apresentou acidez de 1,06 mg KOH.g⁻¹. A acidez do petróleo é atribuída a presença de ácidos naftênicos que são misturas complexas de ácidos carboxílicos lineares e ramificados, e é utilizada como um indicativo de corrosividade da amostra, mas não caracteriza a qualidade do petróleo e nem a natureza específica dos ácidos presentes (Clement e Fedorak, 2005; Edge *et al.*, 2010). De acordo com o revisado por Gruber *et al.* (2013) os petróleos da América do Sul, incluindo do Brasil, são os mais ácidos do mundo, a acidez interfere no refino, aproveitamento dos resíduos, causa corrosão e tem implicações comerciais e ambientais.

Os ácidos naftênicos ocorrem naturalmente no petróleo, são compostos orgânicos altamente solúveis em água e uns dos compostos mais tóxicos liberados no ambiente aquático por efluentes de refinarias e águas residuais da extração de betume, uma forma sólida de petróleo retirada do subsolo (Clement e Fedorak, 2005; Young *et al.*, 2008).

Os ácidos naftênicos apresentam ampla toxicidade para os organismos aquáticos, como efeitos letais agudos, inibitórios, induzem vários efeitos tóxicos subletais (Clement e Fedorak, 2005) e são acumulados em peixes (Young *et al.*, 2008).

Tabela 1. Caracterização físico-química do petróleo.

Parâmetro	Resultado
Acidez total (mg KOH.g ⁻¹)	1,06
Água e sedimentos (%v/v)	0,30
Teor de sal (mg.L ⁻¹)	328,00
Gás sulfídrico - H ₂ S (ppm)	0,9
Densidade específica (g.cm ⁻³ a 20°C)	0,89
Densidade (°API)	26,40
Faixa de ebulição (°C à 1 atm)	32 – 400

A água, o sedimento e os sais são impurezas do petróleo que causam problemas no processamento, como corrosão e entupimento de equipamentos (Manning e Thompson, 1995, ASTM, 2011). A determinação do teor de água e sedimento é necessária para medir com precisão o volume de petróleo e avaliar o seu preço de mercado (ASTM, 2011).

O teor de água é geralmente maior que teor de sedimentos e em conjunto eles não excedem 1% (v/v) do petróleo cru (Drews, 1998). O teor de água pode variar de acordo com o local de extração e é maior em locais mais antigos ou quando a extração é realizada com a tecnologia de injeção de água. A maior parte da água e do sedimento é geralmente separada em campo para otimizar o transporte (McCoy *et al.*, 2007).

A retirada da água do petróleo é difícil devido às emulsificações formadas e a quantidade de sal aumenta a estabilidade da emulsão, dificultando esse processo (Antes *et al.*, 2013). Os sais, constituídos por cloretos de cálcio, sódio e magnésio, se

encontram dissolvidos no conteúdo de água. Os sais causam diversos problemas no processamento, como corrosão e entupimento de equipamentos. Desta forma, a dessalinização é um dos primeiros passos no processo de refino do petróleo (Manning e Thompson, 1995).

A concentração de gás sulfídrico (H_2S) foi de 0,9 ppm. Esse gás é extremamente tóxico e presente no petróleo cru e produtos refinados, por essa razão, a concentração de gás sulfídrico nos destilados é regulamentada pela legislação ambiental de controle de emissão de tóxicos (Manning e Thompson, 1995).

O petróleo cru pode ser classificado como leve, médio ou pesado de acordo com o grau API da American Petroleum Institute que é uma relação entre a densidade do petróleo e da água. O petróleo utilizado neste estudo apresentou densidade de 26,4 °API sendo considerado petróleo médio ou intermediário.

Petróleos pesados tem menos de 22,3 °API; petróleos intermediários compreendem a faixa entre 22,3 à 31,1 °API e petróleos leves tem densidade maior que 31,1 °API. O grau API é umas das principais características do petróleo do ponto de vista econômico, pois indica o valor de mercado e rendimento de destilados. Os petróleos mais leves são mais valorizados pelas refinarias porque contém maiores quantidades de hidrocarbonetos que podem ser convertidos a gasolina. Além dos aspectos econômicos, a caracterização é importante do ponto de vista ambiental, pois afeta o comportamento, persistência e a toxicidade do petróleo (ITOPF, 2011a).

A densidade API é uma característica importante do ponto de vista ambiental, pois quanto mais leve o óleo maior sua capacidade de flutuação na água, maior a concentração de voláteis e menor a viscosidade. Petróleos médios, como o utilizado no presente estudo, tem características intermediárias que afetam o intemperismo e a toxicidade, e tem alta capacidade de emulsificação (ITOPF, 2011a). A emulsão é formada quando um líquido se dispersa em outro formando gotículas imiscíveis entre si (Schramm, 1992).

Emulsões com alto índice de água tendem a ser estáveis e difíceis de serem “quebradas”, este é um dos principais problemas na recuperação e limpeza de um derramamento de petróleo (Iida et al., 2007). Essa dificuldade está relacionada com as propriedades da emulsão resultante: alta viscosidade, aumento de volume, densidade e persistência ambiental (Dalmazzone et al., 1995; Iida et al., 2007). Em água salgada, as emulsões podem absorver grandes volumes de água, representando uma expansão de 3 a 5 vezes do volume original do petróleo (Fingas, 1995).

As características de destilação do petróleo, como pressão de vapor, viscosidade e ponto de ebulição também são aspectos importantes para a indústria petrolífera e podem fornecer informações sobre comportamento do petróleo no ambiente, assim como sua toxicidade, e são dependentes da sua composição química, como proporção de compostos voláteis, quantidade de asfaltenos, resinas e ceras (ITOPF, 2011a).

Quanto mais leve o petróleo ou mais fluido seu composto derivado, menor é a viscosidade, que é uma medida de fluxo. Substâncias com baixa viscosidade fluem mais que aquelas com baixa viscosidade e podem se espalhar na água por centenas de quilômetros quadrados em poucos dias. As informações de pressão de vapor refletem a volatilidade da amostra, quanto mais volátil, menor o tempo de permanência no ambiente, pois a evaporação, assim como a dispersão, contribui para a remoção do petróleo superficial (ITOPF, 2011a).

O petróleo é formado por cadeias de hidrocarbonetos de diferentes tamanhos o que confere a sua ampla faixa de ponto de ebulição (32 – 400 °C). O ponto de ebulição é correlacionado ao número de átomos de carbono da estrutura e quanto maior o número de carbonos maior o ponto de ebulição (Farrell-Jones, 2003), e hidrocarbonetos menores tem menor ponto de ebulição e são mais voláteis que os hidrocarbonetos de cadeias longas. A partir desse princípio é realizada a destilação fracionada que separa os compostos do petróleo através do aquecimento, volatilização e posterior condensação (Radovic e Schobert, 1992).

No processo de destilação, conforme a temperatura é aumentada, diferentes substâncias vão atingindo seu ponto de ebulição em sucessão, evaporam, são resfriadas e condensam, havendo a separação dos compostos de acordo com a faixa de temperatura. A gasolina por exemplo, é composta por mais de 250 compostos de C5-C12, compreendendo uma faixa de ebulição de 35 à 200°C (Farrell-Jones, 2003). Alguns tipos de petróleos têm substâncias que não são destiladas mesmo em temperaturas muito elevadas, esse tipo de petróleo apresenta alta persistência ambiental (ITOPF, 2011a).

O petróleo introduzido no ambiente aquático passa por intemperismos que alteram suas características físico-químicas ao longo do tempo. O espalhamento, evaporação e dispersão são fatores importantes no estágio inicial de intemperismo, enquanto a foto-oxidação, biodegradação e sedimentação são processos mais tardios que determinam o destino final do petróleo (Figura 1). O tempo para que esses

processos ocorram depende das condições ambientais e das características do petróleo, como densidade, viscosidade, volatilidade, entre outros (ITOPF, 2011a).

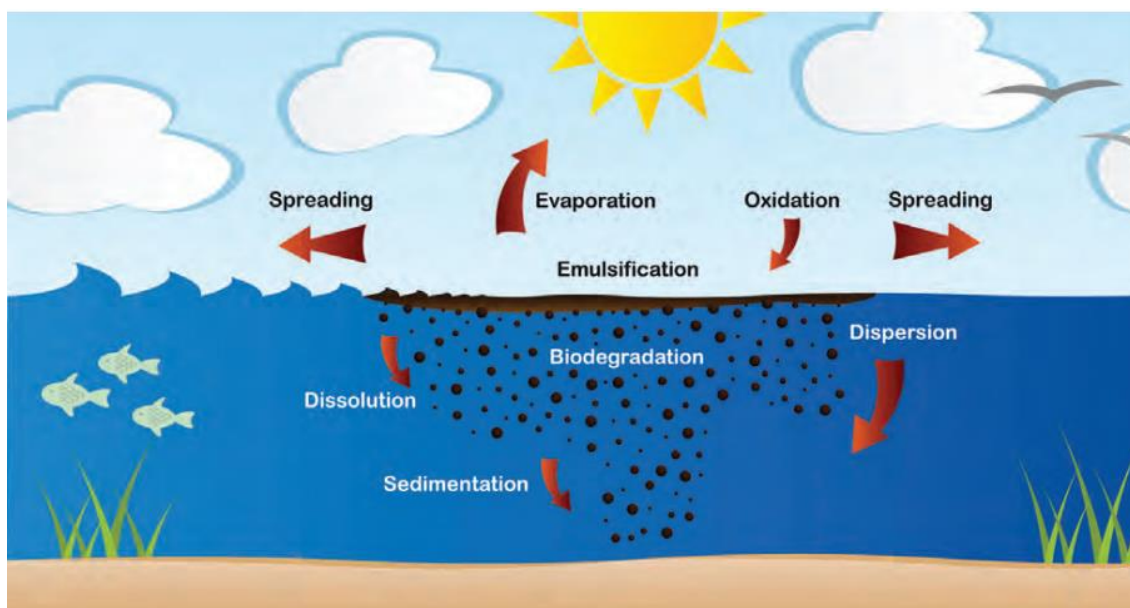


Figura 1. Processos de intemperismo do petróleo em ambiente marinho. Fonte: ITOPF, 2011a.

A caracterização físico-química da gasolina está apresentada na Tabela 2. A amostra é formada por hidrocarbonetos alifáticos saturados, predominantemente de octanos (C_8H_{18}); compostos oxigenados formados principalmente por etanol; hidrocarbonetos aromáticos com 0,55% de benzeno e por hidrocarbonetos alifáticos insaturados em menor concentração.

Tabela 2. Caracterização físico-química da gasolina.

Parâmetro	Resultado
Oxigenados	22,95
Metanol (%v/v)	0,00
Etanol (%v/v)	21,55
Éter metil-terc-butílico - ETBE (%v/v)	1,40
Metil tert-butil éter – MTBE (%v/v)	0,00
Hidrocarbonetos insaturados (%v/v)	3,90
Hidrocarbonetos saturados (%v/v)	61,40
Hidrocarbonetos aromáticos (%v/v)	11,20
Benzeno (%v/v)	0,55
Enxofre total (ppm)	248,00
Carbono (%massa)	78,42
Hidrogênio (%massa)	13,51
Oxigênio (%massa)	8,07
Pressão de vapor à 37,8°C (KPa)	57,00
Ponto inicial de ebulição - PIE (°C)	38,60
10% vol. evap. (°C)	54,80
50% vol. evap. (°C)	72,20
90% vol. evap. (°C)	157,80
Ponto final de ebulição PFE (°C)	206,70
Resíduo (mL)	1,20
Perda (mL)	1,00
Massa específica à 20°C (g.cm ⁻³)	0,75
Octanagem RON	93,00
Octanagem MON	83,60
Poder calorífico inferior (kcal.Kg ⁻¹)	9923,00
Cor	Amarela
Aspecto	Límpido/sem impurezas

As características físico-químicas da gasolina fornecem informações sobre os padrões de qualidade do combustível, mas podem ser indicadores do comportamento da substância no ambiente e também são importantes para comparação com amostras de diferentes regiões.

Todas as características físico-químicas da gasolina utilizada neste estudo se enquadram nos padrões de qualidade nacionais (ANP, 2011; ANP, 2013) e internacionais (US EPA 2004; 2007; 2013; 2014; EU, 1998; 1999; 2000; 2003; Canada, 2013), exceto para as concentrações de enxofre e etanol, que atendem apenas à legislação brasileira.

A amostra de gasolina analisada apresentou 248 ppm de enxofre, excedendo os limites internacionais. Na Europa (EU, 1998) e nos Estados Unidos da América (US EPA, 2014) a concentração permitida é de até 10 ppm. No Brasil, durante o período de amostragem era permitido 800 ppm de enxofre (ANP, 2011), este limite foi atualmente restringido à 50 ppm (ANP, 2013). A composição da gasolina vem sendo modificada em diversos países para diminuir a emissão de compostos tóxicos como enxofre e atender a lei Clean Air Act Amendments.

Os combustíveis são normalmente identificados por dois tipos de octanagens, que são o MON (motor octane number) e o RON (research octane number) e referem-se à capacidade da gasolina em resistir a detonação, ou seja, a sua compressibilidade sendo expressa pela quantidade relativa de iso-octano, que é, dentre os compostos presentes na gasolina, o que apresenta a maior compressibilidade. Os hidrocarbonetos de cadeias longas e lineares produzem grande quantidade de espécies facilmente detonáveis, enquanto que hidrocarbonetos ramificados ou aromáticos são mais resistentes à detonação (Cruz, 2003).

Para aumentar a octanagem e performance da gasolina são adicionados compostos oxigenados como metanol, etanol, éter metil-terc-butílico (ETBE) e metil tert-butil éter (MTBE) (Farrell-Jones, 2003). Esses compostos agem como antidetonantes e substituem o uso do chumbo tetraetila, que é altamente tóxico, e promovem uma redução na emissão de monóxido de carbono (CO), óxido nítrico (NOx) e formaldeídos (Cruz, 2003).

O principal aditivo oxigenado presente na amostra foi o etanol (etanol anidro combustível), correspondendo à 21,55 % do volume total da gasolina. No Brasil, a adição de etanol anidro combustível na gasolina passou recentemente de 25% para 27% (Brasil, 2015), enquanto que em outros países, a concentração não pode

ultrapassar de 5%. Esse alto volume de etanol anidro na gasolina brasileira é atribuído à questão econômica, pois o país é um grande produtor de etanol voltado para o abastecimento do mercado de combustíveis (Cruz, 2003).

No entanto, esse grande volume de etanol anidro na gasolina altera o comportamento dos compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) em situações de contaminação do lençol freático por gasolina. O etanol é completamente solúvel em água e aumenta a solubilidade dos BTEX, levando à maior mobilidade desses compostos dissolvidos na água subterrânea, além disso pode dificultar a biodegradação natural dos BTEX e aumentar a sua persistência na água subterrânea (Corseuil e Marins, 1997).

A gasolina é uma mistura de compostos tóxicos e entre os mais perigosos estão o benzeno e vários hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são considerados potencialmente carcinogênicos para humanos (IARC, 1983; 2005; 2010; 2012).

Os hidrocarbonetos aromáticos, em geral, são compostos polares, com baixa solubilidade em água e voláteis. Essas características conferem pouca estabilidade no ambiente aquático e rápida eliminação do organismo, porém, apesar dessas características, esses compostos e seus metabólitos são bioacumulados (Roubal *et al.*, 1977; Melancon e Lech, 1978), sendo potencialmente tóxicos para peixes, com efeitos de letalidade aguda e subletais como redução do crescimento larval (DeGraeve *et al.*, 1982), alterações fisiológicas, bioquímicas, genéticas e histopatológicas (Akaishi *et al.*, 2004; Pacheco e Santos, 2001).

As características de pressão de vapor e de destilação indicam a volatilidade da gasolina. Compostos mais voláteis, tem maior pressão de vapor e alta proporção de componentes que atingem o ponto de ebulição às baixas temperaturas (ITOPF, 2011a). A pressão de vapor da gasolina analisada foi 57,0 KPa à 37,8 °C, estando de acordo com as normas da Agência Nacional de Petróleo (ANP, 2013). Essa regulamentação é um controle de qualidade importante para o rendimento da gasolina, pois quanto maior a pressão de vapor, maior é a formação de bolhas de vapor no sistema de injeção de combustível, provocando assim, o impedimento da passagem do mesmo (Araújo *et al.*, 2003).

A massa específica ou densidade da gasolina foi de 0,75 g.cm⁻³ à 20°C, sendo menor que a densidade do petróleo que foi de 0,89 g.cm⁻³ à 20°C. Essa diferença ocorre pois a gasolina é uma fração do petróleo que corresponde a uma faixa de

hidrocarbonetos menores, predominantemente de octanos, sendo menos densos e relativamente mais solúveis em água.

A menor densidade da gasolina indica maior fluidez na água e solubilidade, assim a gasolina pode se espalhar mais que o petróleo em eventos de contaminação do ambiente aquático. Além disso, a gasolina pode atingir o lençol freático causando a contaminação de aquíferos utilizados como fonte de abastecimento para consumo humano (Corseuil e Marins, 1997).

Essas diferenças físico-químicas entre o petróleo e a gasolina tem implicações no comportamento dessas substâncias no ambiente aquático assim como na sua toxicidade (Figura 2).

Estudos indicam que os destilados são mais tóxicos que o petróleo, e quanto mais refinado o produto maior é a toxicidade aos organismos aquáticos devido à maior mobilidade ambiental e maior liberação de hidrocarbonetos aromáticos na água que tornam-se biodisponíveis (Pacheco e Santos, 2001; Rodrigues *et al.*, 2010).



Figura 2. Os efeitos nos organismos aquáticos marinhos variam através de um espectro de toxicidade causados especialmente por petróleos leves e destilados até sufocamento por petróleos intermediários, pesados (IFO e HFO) e resíduos intemperizados. Fonte: ITOPF, 2011b.

Considerações finais

O petróleo é uma mistura complexa cuja composição varia de acordo com sua origem e suas características influenciam, além dos aspectos econômicos, no comportamento ambiental e toxicológico. Dessa forma, torna-se indispensável a caracterização físico-química do petróleo e de seus produtos destilados para o manejo de áreas impactadas e para avaliação dos efeitos nos organismos afetados.

Referências

ABNT, Associação brasileira de normas técnicas (2008) Motor gasoline - Determinations of fuel anhydrous ethylic alcohol content, (NBR 13992).

ABNT, Associação brasileira de normas técnicas (2011) Distillate fuel - Visual inspection, (NBR 14954).

Akaishi FM, Silva de Assis HC, Jakobi SCG, Eiras-Stofella DR, St-Jean SD, Courtenay SC, Lima EF, Wagener ALR, Scofield AL, Oliveira Ribeiro CA (2004) Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:244 –253.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2011) Resolução nº57 de 20 de outubro de 2011, Diário oficial da união, seção 1, ISSN 1677-7042, pp. 158-159. <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, cod. 00012011102100158.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2013) Resolução nº40 de 25 de outubro de 2013, Diário oficial da união, seção 1, ISSN 1677-7042, pp. 55-56. <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, cod. 00012013103000055.

Antes FG, Pereira JSF, Diehl LO, Pereira LSF, Boeck P, Guimarães RCL, Guarnieri RA, Ferreira BMS, Santos MFP, Foletto LE, Flores EMM (2013) Sediment removal from crude oil emulsion using microwave radiation. *J Braz Chem Soc* 24:1287-1294.

Araújo LC, Carvalho FR, Stragevitch L (2003) Aplicação da termodinâmica contínua na modelagem da pressão de vapor da gasolina automotiva. In: 2º Congresso Nacional em P&D em Petróleo e Gás Natural, Rio de Janeiro, UFRJ, 7p.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2001a) Standard practice for manual sampling of petroleum and petroleum products, (D 4057). Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, PA, USA.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2001b) Standard test method for vapor pressure of petroleum products (Mini Method), (D 5191). Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, PA, USA.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2001c) Standard test method for distillation of petroleum products at atmospheric pressure, (D 86). Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, PA, USA.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2001d) Standard test method for density and relative density of liquids by digital density meter 1, (D 4052). Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, PA, USA.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2010a) Standard Test Method for Salt in Crude Oils (Potentiometric Method) (D 6470). Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, PA, USA.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2010b) Standard test method for sulfur in petroleum and petroleum products by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry, (D 4294). Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, PA, USA.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2011) Standard Test Method for Water and Sediment in Crude Oil by the Centrifuge Method (Laboratory Procedure) (D 4007). Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, PA, USA.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2012a) Standard Test Method for Density, Relative Density, or API Gravity of Crude Petroleum and Liquid Petroleum Products by Hydrometer Method (D 1298). Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, PA, USA.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2012b) Standard test method for determination of benzene in spark-ignition engine fuels using mid infrared spectroscopy, (D 6277). Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, PA, USA.

Brasil (2015) Portaria nº 75 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, publicada no Diário Oficial da União – DOU, nº44, seção 1, pag.17, no dia 6 de março de 2015 17 ISSN 1677-7042.

Canada (2013) Compliance promotion information package for the CEPA 1999. Fuels regulations oil, gas and alternative energy division, Environment Canada, Gatineau, 29p.

Cantagallo C, Milanelli JCC, Dias-Brito D (2007) Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. *Panam J Aquat Sci* 2:1-12.

Clean Air Act Amendments of 1990 (Public Law 101–549) <http://www.epw.senate.gov/envlaws/cleanair.pdf>

Clemente JS, Fedorak PM (2005) A review of the occurrence, analyses, toxicity, and biodegradation of naphthenic acids. *Chemosphere* 60:585-600.

Corseuil HX, Marins MDM (1997) Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave? *Ver Eng Sanit Amb* 2:50–54.

Cruz MJF (2003) Determinação experimental e predição da pressão de vapor de gasolinas com aditivos oxigenados. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, 103p.

Dalmazzone C, Bocard C, Ballerini D (1995) IFP Methodology for developing water-in-crude oil emulsion inhibitors. *Spill Sci Technol B* 2:145-150.

DeGraeve GM, Elder RG, Woods DC, Bergman HL (1982) Effects of naphthalene and benzene on Fathead Minnows and Rainbow Trout. *Arch Environm Contam Toxicol* 11:487-490.

DIN, Deutsches Institut für Normung (1991) German standard methods for the examination of water, wastewater and sludge; substance group analysis (group F); determination of benzene and some of its derivatives by gas chromatography (F9), (DIN 38407 F9).

Drews AW (1998) Manual on hydrocarbon analysis. 6th ed. ASTM, West Conshohocken, PA, USA, 1061p. ISBN 0-8031-2080-X.

Edge K, Barona B, Young RF, Fedorak PM, Wismer WV (2010) Odor detection thresholds of naphthenic acids from commercial sources and oil sands process-affected water. *Chemosphere* 81:932-939.

EU, European Commission (1998) Directive 98/70/EC of the European Parliament and of the Council of 13 October 1998 relating to the quality of petrol and diesel fuels and amending Council Directive 93/12/EEC.

EU, European Commission (1999) Council Directive 1999/32/EC of 26 April 1999, relating to a reduction in the sulphur content of certain liquid fuels and amending Directive 93/12/EEC.

EU, European Commission (2000) Commission Directive 2000/71/EC of 7 November 2000 to adapt the measuring methods as laid down in Annexes I, II, III and IV of Directive 98/70/EC of the European Parliament and of the Council to technical progress as foreseen in Article 10 of that Directive.

EU, European Commission (2003) Directive 2003/17/EC of the European Parliament and of the Council of 3 March 2003 amending Directive 98/70/EC relating to the quality of petrol and diesel fuels.

Farrell-Jones (2003) Petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Thompson KC, Nathanail CP (Eds.) *Chemical analysis of contaminated land*. CRC Press, Boca Raton, pp.132-188.

Fingas M (1995) Water-in-oil emulsion formation: a review of physics and mathematical modeling. *Spill Sci Technol B* 2:55-595.

Gruber LDA, Damasceno FC, Caramão EB, Jacques RA, Geller AM, Campos MCV (2012) Naphthenic acids in petroleum. *Quim Nova* 35:1423-1433.

IARC, International Agency for Research on Cancer (1983) Polynuclear Aromatic Compounds, Part I, Chemical, Environmental and Experimental Data. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization (WHO), v. 32, Lyon, 457p.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2005) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Benzene, World Health Organization (WHO), LYON, FRANCE, v.100F, pp.249-294.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2010) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some non-heterocyclic polycyclic

aromatic hydrocarbons and some related exposures, World Health Organization (WHO), v. 92, Lyon, France, ISBN 978 92 832 1292 8.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2012) Benzene. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization (WHO), v. 29, Sup 7,100F, Lyon.

lida, PH, Scheer AP, Weinschutz R, Santos BM (2007) Estudo do efeito da água em emulsões de petróleo. 4º PDPETRO, ABPG, Campinas, Brasil, 10 p.

ITOPF, The International Tanker Owners Pollution Federation Limited (2011a) Fate of marine oil spills. Technical Information Paper 2, London, UK, 12p.

ITOPF, The International Tanker Owners Pollution Federation Limited (2011b) Effects of oil pollution in the marine environment. Technical Information Paper 13, London, UK, 12p.

ITOPF, The International Tanker Owners Pollution Federation Limited (2011c) Effects of oil pollution on fisheries and mariculture. Technical Information Paper 11, London, UK, 12p.

Kennish MJ (1992) Ecology of estuaries: anthropogenic effects. CRC Press, Boca Raton, 450p.

Manning, FS, Thompson RE (1995) Oilfield processing of petroleum: crude oil. PennWell Books, Tulsa, Oklahoma, vol. 2, 400 p.

Melancon MJ, Jr., Lech JJ (1978). Distribution and elimination of naphthalene and 2-methylnaphthalene in rainbow trout during short and long-term exposures. Arch Environ Contam Toxicol 7:207-220.

McCoy J, Di Nicolantonio A, Stell R (2007) Steam cracking of partially desalted hydrocarbon feedstocks. Patent US20070004952 A1.

NTP, Normas Técnicas da Petrobras (2014) determinação de gás sulfídrico e enxofre mercaptídico em hidrocarbonetos líquidos - método potenciométrico (N 1380 E). CONTEC - Comissão de Normas Técnicas.

NTP, Normas Técnicas da Petrobras (1995) Petróleo e derivados -determinação do índice de acidez (N 1611 B). CONTEC - Comissão de Normas Técnicas.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development (1992) Guideline for the testing of chemicals. Fish, acute toxicity test. Part 203.

Pacheco M, Santos MA (2001) Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicol Environ Saf 49:64–75.

Radovic LR, Schobert HH (1992) Energy and fuels in society. College custom series. McGraw-Hill, 422 p. ISBN 0070510997.

Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA (2010) Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci Total Environ* 408:2054–2059.

Roubal WT, Collier TK, Malins DC (1977) Accumulation and metabolism of carbon-14 labeled benzene, naphthalene, and anthracene by young coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Arch Environ Contam Toxicol* 5:513-529.

Schramm LL (1992) Petroleum emulsions: Basic Principles. In: SCHRAMM LL Emulsions: Fundamentals and applications in the petroleum industry, Advanced Chemistry Series 231. Washington: ACS, pp. 79-129.

SM, Standard methods for the examination of water and wastewater (2005a) EDTA titrimetric method, (2340 C). 21th ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 2: 37-39.

SM, Standard methods for the examination of water and wastewater (2005b) Polynuclear aromatic hydrocarbons, (6440 C). 21th ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 6:86-91.

Tiburtius, ERL, Peralta-Zamora P, Leal ES (2004) Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova* 27:441-446.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (2004) Gasoline and Sulfur Emissions Reduction Program: Automotive Standards under the Clean Air Act Amendments of 1990, December 1999 (Tier 2).

US EPA, United States Environmental Protection Agency (2007) Regulatory Announcement: Control of Hazardous Air Pollutants from Mobile Sources: Final Rule to Reduce Mobile Source Air Toxics (EPA420-F-07-017) Office of Transportation and Air Quality. EPA, Washington, 5p.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (2013) Draft Regulatory Impact Analysis: Tier 3 Motor vehicle emission and fuel standards (EPA-420-D-13-002) Assessment and Standards Division Office of Transportation and Air Quality, EPA, Washington, 532p.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (2014) Regulatory Announcement: Tier 3 Motor Vehicle Emission and Fuel Standards (EPA-420-F-14-009) Office of Transportation and Air Quality. EPA, Washington, 5p.

Young RF, Wismer WV, Fedorak PM (2008) Estimating naphthenic acids concentrations in laboratory-exposed fish and in fish from the wild. *Chemosphere* 73:498–505.

CAPÍTULO 2

A escolha entre peixes nativos ou exóticos em testes ecotoxicológicos: balanço entre a relevância ecológica e a padronização.

Resumo

Danio rerio é um peixe padronizado em estudos ecotoxicológicos, apresenta vantagens adaptativas, é de fácil cultivo e manutenção. Apesar disto, nos perguntamos se esta espécie responde de forma equivalente aos peixes endêmicos neotropicais em relação ao risco de exposição aos compostos derivados do petróleo, que são contaminantes de rios e lagos de água doce em países tropicais. Desta forma, o presente estudo objetivou comparar a sensibilidade de resposta em teste de letalidade aguda da espécie padronizada *Danio rerio* com o peixe endêmico brasileiro *Astyanax altiparanae*. Os peixes foram expostos à fração solúvel da gasolina (FSG), um perigoso contaminante ambiental e à substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). A concentração letal mediana (CL_{50}) para a espécie *A. altiparanae* foi: FSG- CL_{50} = 15% e $K_2Cr_2O_7$ - CL_{50} = 75mg.L⁻¹; e para *D. rerio* obteve-se: FSG- CL_{50} = 20% e $K_2Cr_2O_7$ - CL_{50} = 84 mg.L⁻¹. Nos tratamentos com a FSG foi observada diferença significativa entre as espécies. Através de análise de regressão foi observado efeito dose-resposta similar, no entanto, o valor de r^2 foi maior para *A. altiparanae*, indicando maior relação da resposta mortalidade em função da dose/concentração. Esses resultados mostram que *A. altiparanae* é um organismo sensível e pode ser utilizada em testes de toxicidade aguda. Sugere-se o uso de espécies nativas em testes ecotoxicológicos para avaliação do risco de exposição à xenobióticos e para a preservação da biodiversidade local.

Palavras-chave: toxicidade, CL_{50} , bioindicador, peixes.

Introdução

Danio rerio, popularmente conhecido como zebrafish, é uma espécie de peixe de água doce nativa do Sul da Ásia que tem sido amplamente utilizada como modelo experimental em diversas áreas de ciências biológicas, inclusive em ecotoxicologia, devido principalmente à sua capacidade adaptativa (Lawrence, 2007).

Em estudos ecotoxicológicos, a seleção do organismo teste deve ser baseada em uma série de fatores: sensibilidade a várias substâncias, disponibilidade, representatividade em vários ecossistemas e fácil manutenção e cultivo em condições de laboratório (US EPA, 1994). Neste contexto, várias agências regulatórias indicam o uso de *D. rerio* em testes de letalidade aguda para avaliação de toxicidade de agentes químicos, efluentes e amostras ambientais, determinação de critérios de qualidade da água, avaliação de possíveis riscos às espécies similares no ambiente natural e para a análise de correlação com os resultados de outras espécies para fins comparativos (OECD, 1992; US EPA, 1996; ABNT, 2011).

Uma característica importante, que torna viável o uso de *D. rerio* em bioensaios é a sua tolerância às alterações ambientais (Lawrence, 2007). No entanto, é importante avaliar se esta capacidade adaptativa não torna a espécie mais resistente aos xenobióticos. O uso de organismos resistentes em ensaios ecotoxicológicos pode subestimar a toxicidade dos poluentes e colocar em risco outras espécies mais sensíveis à exposição. Neste contexto, a utilização de peixes nativos e até endêmicos tem sido defendida em oposição ao uso de espécies exóticas em estudos ecotoxicológicos, sendo importante para ampliar conhecimento sobre as respostas de espécies locais frente aos diferentes poluentes no ambiente aquático (Matsumoto e Cólus, 2000; Akaishi *et al.*, 2004; Ramsdorf, 2011).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 2002) reconhece que alguns laboratórios utilizam espécies nativas para a realização dos testes de toxicidade e que estes organismos apresentam a mesma ou até maior sensibilidade que as espécies padronizadas. No entanto, a agência recomenda a utilização de espécies nativas apenas quando existe proibição de importação de espécies exóticas ou quando existe regulamentação para seu uso e sugere a comparação da sensibilidade do organismo nativo em relação à resposta da espécie padronizada utilizando uma substância referência.

O uso de espécies padronizadas em ensaios ecotoxicológicos é importante para haver homogeneidade de resposta e para a comparação dos efeitos de diferentes xenobióticos. No entanto, devido a variabilidade interespecífica de resposta a exposição a agentes tóxicos, é necessário utilizar espécies de peixes nativos como organismos sentinelas (Çavaş *et al.*, 2005).

Na região neotropical algumas espécies de peixes nativas têm sido utilizadas em bioensaios e/ou como bioindicadoras de contaminação ambiental. Em ambientes estuarinos e marinhos podemos citar: *Mugil sp.*; *Netuma sp.* (Andrade *et al.*, 2004); *Bathygobius soporator* (Galindo e Moreira, 2009); *Atherinella brasiliensis* (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2013) e *Cathorops spixii* (Katsumiti *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2014). E entre os peixes de água doce podemos citar as espécies *Corydoras paleatus* (Ghisi e Cestari, 2013); *Geophagus brasiliensis* (Clemente *et al.*, 2010; Benincá *et al.*, 2012; Osório *et al.*, 2013); *Hoplias malabaricus* (Cestari *et al.*, 2004; Ferraro *et al.*, 2004; Ramsdorf *et al.*, 2009; Vicari *et al.*, 2012); *Prochilodus lineatus* (Vanzella *et al.*, 2007; Liebel *et al.*, 2011) e *Rhamdia quelen* (Pamplona *et al.*, 2011; Mela *et al.*, 2013), sendo que são frequentes os trabalhos com o gênero *Astyanax*, como *A. bimaculatus* (Matsumoto e Cólus, 2000; Silva *et al.*, 2010), *Astyanax sp* (Rossi *et al.*, 2011; Ramsdorf *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014); *Astyanax spB* (Erbe *et al.*, 2011).

Peixes do gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854), popularmente conhecidos como “lambari”, têm sido considerados bons bioindicadores para avaliação de diferentes contaminantes *in situ* e em bioensaios (Silva *et al.*, 2010; Trujillo-Jiménez *et al.*, 2011; Ramsdorf *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2014). Este gênero é o mais representativo da subfamília Tetragonopterinae, sendo dominante na América do Sul (Eigenmann, 1921) com ampla distribuição geográfica na região Neotropical (Garutti e Britski, 2000). A espécie *A. altiparanae* proposta como organismo-teste neste estudo é um peixe brasileiro, endêmico da bacia hidrográfica do Alto Paraná (Leuzzi *et al.*, 2004).

O Alto Paraná é uma ecoregião com alto grau de endemismo (Abell *et al.*, 2008), apresentando 131 espécies e 7 gêneros endêmicos, sendo a família Characidae uma das mais representativas, segundo os dados da Freshwater Ecoregions of the World (FEOW).

Baseado nestas considerações, o presente estudo objetivou comparar as respostas ecotoxicológicas da espécie padronizada *D. rerio* e o peixe endêmico neotropical *A. altiparanae*, através do teste de letalidade aguda com exposição à

substância referencia dicromato de potássio e à fração solúvel da gasolina que é uma mistura de hidrocarbonetos tóxicos, frequentemente encontrado nos corpos hídricos.

Material e Métodos

As amostras de gasolina foram coletadas em frascos âmbar de 1 litro (ASTM, 2001) em diferentes postos de gasolina do estado do Paraná, Brasil. As amostras foram homogeneizadas para a preparação da fração solúvel da gasolina (FSG).

A FSG foi preparada em uma capela, à temperatura ambiente e na ausência de luz, de acordo com Anderson *et al.* (1974), com modificações (Pacheco e Santos, 2001). Foi misturada uma parte de gasolina em nove partes de água destilada (1:9), sob rápida agitação durante 20 horas, após este período as amostras ficaram em repouso por 30 minutos para separação das fases. A fase insolúvel foi descartada e a fração solúvel da gasolina (100%) foi utilizada imediatamente após o preparo.

Devido à alta volatilidade dos hidrocarbonetos aromáticos, foi realizado previamente ao teste de letalidade aguda um experimento para determinar o melhor sistema-teste para preservar as características do contaminante. O experimento foi conduzido em aquários de vidro com 20 litros da FSG 100%, revestidos e mantidos em fotoperíodo natural. Foram testados três sistemas-teste: I) semi-estático não aerado: renovação de 25% da solução-teste em cada período de monitoramento e sem aeração; II) estático aerado: sem renovação e com aeração; III) estático não aerado: sem renovação e sem aeração. A concentração de hidrocarbonetos aromáticos foi monitorada nos tempos de 0; 12; 24; 48; 72 e 96 horas.

A quantificação dos hidrocarbonetos monoaromáticos (BTX) da FSG foi feita por cromatografia gasosa/detector de ionização de chama (DIN, 1991) e a análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foi realizada por cromatografia gasosa/espectrômetro de massas (SM, 2005b; ISO, 2011).

O teste de letalidade aguda foi realizado de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2011), Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 1996) e da Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 1992). O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, certificado nº688.

Foi testada a toxicidade da fração solúvel da gasolina (FSG) e da substância de referência Dicromato de potássio - $K_2Cr_2O_7$ (P.M: 294,18 CAS: 7778-50-9, Synth), com peixes adultos das espécies *Danio rerio* ($3,28 \pm 0,8$ cm/ $0,43 \pm 0,7$ g) e *Astyanax altiparanae* ($8,15 \pm 0,9$ cm/ $5,54 \pm 2,7$ g), sendo realizadas modificações no teste para a espécie *A. altiparanae* em relação ao número de indivíduos por réplica.

Os peixes foram aclimatados durante 30 dias em tanques com água filtrada, com aeração constante, alimentação diária, e mantidos sob densidade de estocagem $< 1\text{g.L}^{-1}$ (ABNT, 2011). Posteriormente os peixes foram transferidos para os aquários de teste e aclimatados por mais cinco dias com aeração constante. A alimentação foi interrompida 24 horas antes da contaminação.

Foi realizado um ensaio preliminar de toxicidade com duração de 24 horas de exposição, utilizando cinco concentrações de cada xenobiótico e controle (água filtrada) em replicata. O resultado referente a maior concentração sem efeito observado (CENO) e a menor concentração que causou 100% foi utilizado para calcular o intervalo das concentrações a serem utilizadas no teste definitivo.

O teste definitivo teve duração de 96 horas e foi realizado em aquários de 18 litros, em sistema semi-estático com renovação de 25% da solução-teste a cada 24 horas. Os tratamentos com a FSG foram realizados sem aeração e os aquários revestidos com plástico filme e tampa de vidro para evitar a volatilização dos compostos da FSG. Os testes foram acompanhados por dois grupos controles, um aerado e o outro sem aeração. A solução de renovação foi preparada com água previamente aerada.

Foram utilizados dez indivíduos de *D. rerio* por aquário em replicata, totalizando vinte peixes por tratamento. Para a espécie *A. altiparanae* foi utilizado um peixe por aquário com dez réplicas, totalizando dez peixes por tratamento.

Foram testadas sete concentrações da FSG calculadas por razão de diluição (R.D.) de 1,2 a partir do intervalo definido no teste preliminar. Os indivíduos da espécie *D. rerio* foram expostos às concentrações de 11,58%; 13,89%; 16,67%; 20,0%; 24,0%, 28,8% e 34,57% (v/v). Os indivíduos da espécie *A. altiparanae* foram expostos a 6,7%; 8,04%; 9,65%; 11,58%; 13,89%; 16,67% e 20,0% (v/v) à partir da diluição da FSG 100%.

No teste de toxicidade aguda do dicromato de potássio foi utilizada a razão de diluição 1,3 para *D. rerio* a fim de aumentar a amplitude de concentrações, e foram testadas as concentrações de: 47,8; 62,15; 80,8; 105,04; 136,55; 177,5 e 230,77 mg.L⁻¹

¹. Para *A. altiparanae* a razão de diluição foi de 1,2 e foram testadas as concentrações de 48,23; 57,87; 69,44; 83,33; 100,0; 120,0 e 144,0 mg.L⁻¹.

As variáveis pH, oxigênio dissolvido e temperatura da água foram mensurados com medidor digital (LUTRON DO5510), em todas as soluções-teste nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96h. A dureza (SM, 2005a) foi analisada na água de diluição, na menor e maior concentração de cada contaminante.

Análise estatística

Para comparar a concentração de hidrocarbonetos aromáticos da FSG 100% entre diferentes tratamentos e períodos de amostragem foi utilizado ANOVA 2 critérios, teste-t (LSD).

A Concentração Letal Mediana (CL₅₀) foi estimada através do programa estatístico *Trimmed Spearman-Kärber* "LC50 Programs JSPear Test".

A comparação da letalidade entre as espécies foi realizada através do teste-t pareado nos tratamentos com a FSG e não pareado com o dicromato de potássio.

O efeito dose-resposta para cada espécie foi avaliado por análise de regressão. As repostas de letalidade das espécies foram comparadas em função da concentração e tempo de exposição por ANOVA 2 critérios, teste-t (LSD). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

A concentração de hidrocarbonetos aromáticos mensurados imediatamente após a preparação da fração solúvel da gasolina (FSG 100%) está apresentada na tabela 1. O total de aromáticos foi de 102,1 mg.L⁻¹, constituídos principalmente por BTEX, sendo o tolueno o mais abundante. Entre os HPAs, o naftaleno apresentou a maior concentração. Os HPAs antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, fenantreno, fluoranteno e pireno não foram detectados, sendo o limite de detecção <0,01 µg.L⁻¹.

Tabela 1. Concentração de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) da fração solúvel da gasolina (FSG 100%), mensurados imediatamente após a preparação da amostra (tempo 0 hora).

Hidrocarbonetos	mg.L⁻¹
Benzeno	39,0543
Etilbenzeno	3,2939
Tolueno	47,2922
m,p-Xileno	6,1300
o-Xileno	6,1754
Total BTEX	101,9458
Acenafetileno	0,0002
Acenafteno	0,0006
Fluoreno	0,0005
Naftaleno	0,1462
Total HPAs	0,1475
Σ BTEX e HPAs	102,0933

O monitoramento dos hidrocarbonetos aromáticos da fração solúvel da gasolina (100%) mostrou que em 12 horas houve redução significativa de hidrocarbonetos em todos os sistemas-teste, principalmente no tratamento com aeração. Após 96 horas foi observado que no sistema semi-estático (I) a renovação da solução-teste manteve a concentração mais próxima à inicial, conservando 50,7% de BTEX e 36,5% dos HPAs. No sistema estático aerado (II) houve perda significativa dos hidrocarbonetos, sendo conservados apenas 0,02% de BTEX e 1,09% de HPAs em 96 horas. No sistema estático não aerado (III) ocorreu perda gradual, chegando a concentração final de 6,9% de BTEX e 7,2% de HPAs. A concentração de hidrocarbonetos diferiu significativamente entre os tratamentos (Figura 1).

O sistema semi-estático sem aeração foi o mais eficiente para conservação dos hidrocarbonetos aromáticos da FSG e foi o método empregado no teste de toxicidade aguda.

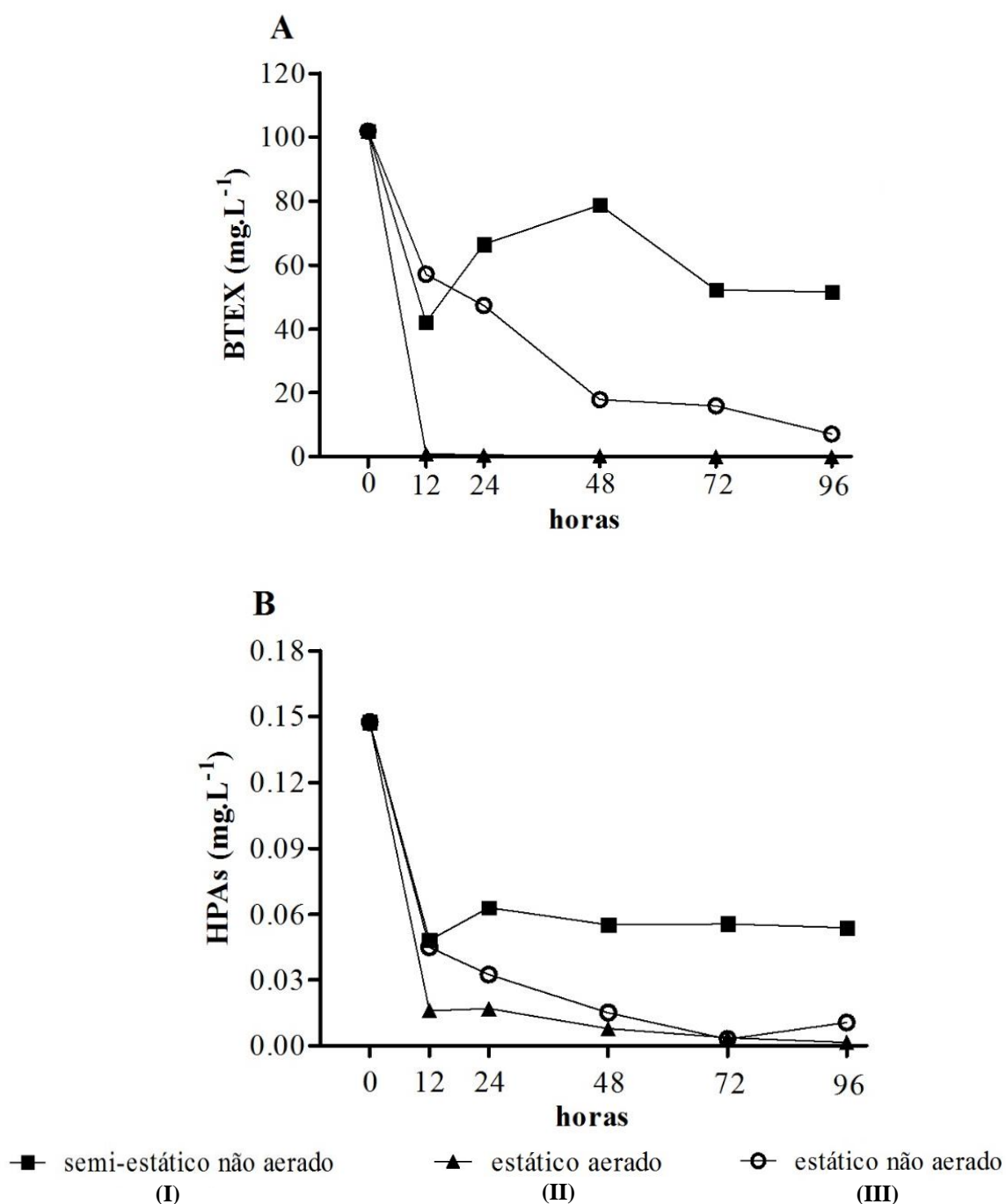


Figura 1. Monitoramento da concentração de hidrocarbonetos aromáticos da FSG 100% em diferentes condições e períodos de amostragem. a) hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX), b) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

A concentração letal mediana (CL₅₀) da FSG e do dicromato de potássio para *Astyanax altiparanae* foi FSG-CL₅₀ = 15% e K₂Cr₂O₇-CL₅₀ = 75 mg.L⁻¹ e para *Danio rerio* obteve-se FSG-CL₅₀ = 20% e K₂Cr₂O₇-CL₅₀ = 84 mg.L⁻¹ (Figura 2). Não houve letalidade nos tratamentos controle (aerado e não-aerado).

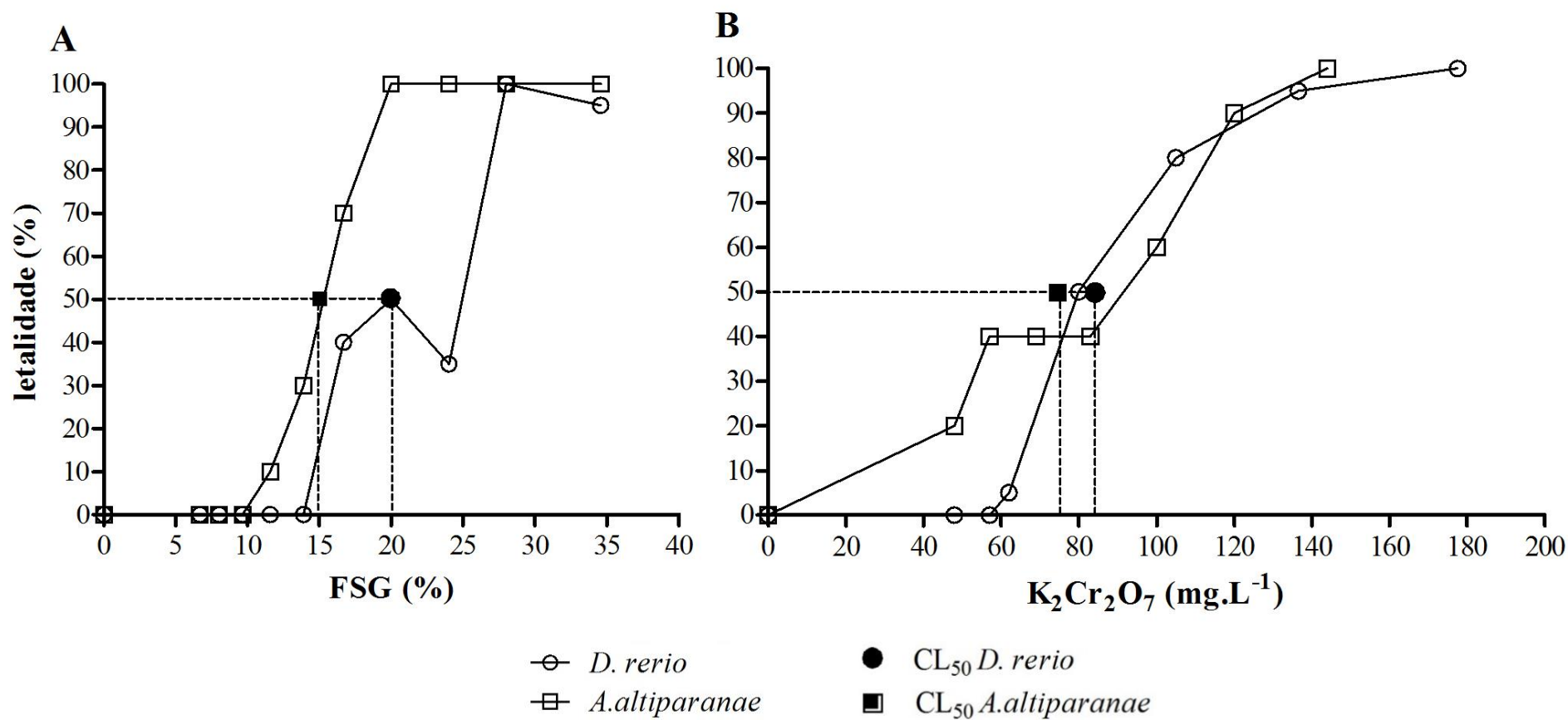


Figura 2. Efeito de letalidade aguda em *Astyanax altiparanae* e *Danio rerio* e estimativa da concentração letal mediana (CL_{50}). Em a) exposição à fração solúvel da gasolina (FSG), b) exposição ao dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).

No teste com a FSG houve diferença significativa da letalidade entre as duas espécies ($p = 0,0330$), já nos tratamentos com o dicromato de potássio a resposta das espécies não diferiu ($p = 0,7122$).

Para as duas espécies foi observado efeito dose-resposta (Figura 3). Não houve diferença entre as retas geradas para cada espécie pela análise de regressão, sendo $p = 0,42$ na exposição à FSG e $p = 0,90$ no tratamento com $K_2Cr_2O_7$, indicando similaridade no padrão de resposta.

Apesar do padrão de resposta não diferir entre as espécies, foi observado que o valor de r^2 foi maior para *A. altiparanae*, tanto na FSG ($r^2 = 0,8111$) quanto para o dicromato de potássio ($r^2 = 0,8405$), em comparação aos valores obtidos para *D. rerio* que foram $r^2 = 0,7876$ para a FSG e $r^2 = 0,7885$ para o dicromato de potássio. Isto demonstra que a espécie nativa brasileira (*A. altiparanae*) apresenta maior efeito de correlação positiva dose-resposta do que a espécie padronizada *D. rerio*.

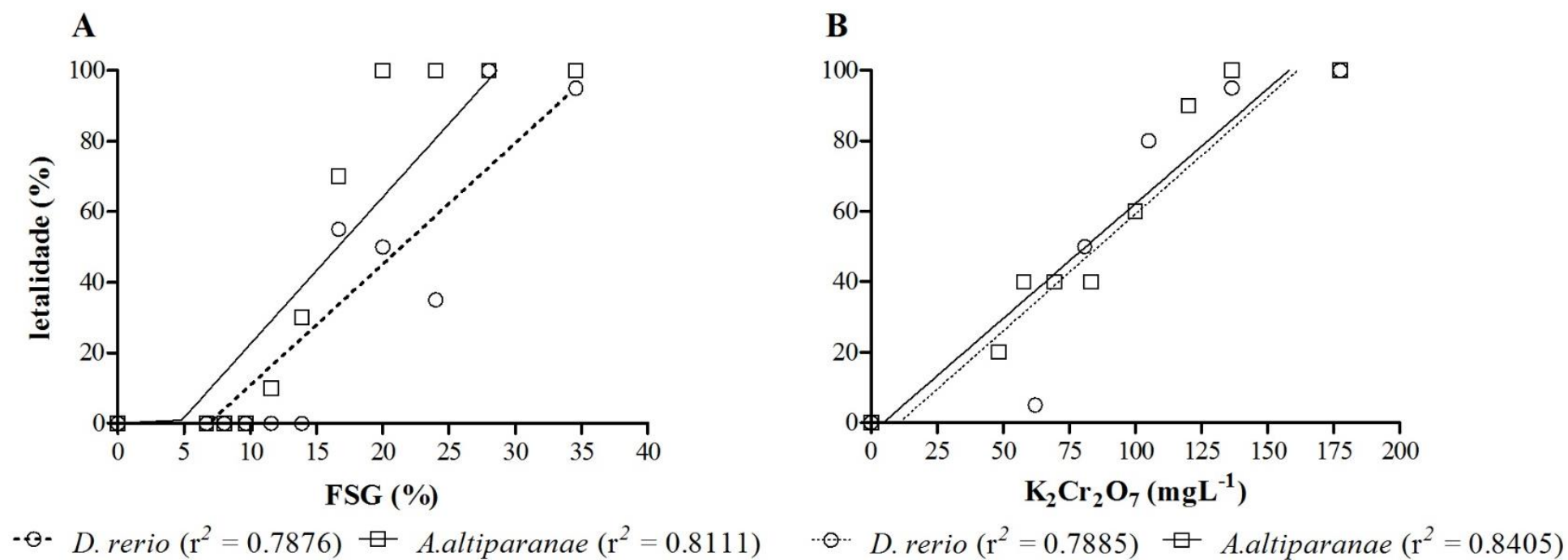


Figura 3. Efeito dose-resposta das espécies *Astyanax altiparanae* e *Danio rerio* obtido através de análise de regressão. Em a) exposição à fração solúvel da gasolina (FSG), b) exposição ao dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).

O tratamento (dose/concentração) foi o principal fator para indução da resposta de letalidade, já o tempo de exposição não teve efeito significativo (Tabela 2). Nos experimentos com *A.altiparanae* foram obtidos maiores valores de fonte de variação total em comparação ao *D.rerio*, indicando que a resposta de letalidade em *A.altiparanae* está mais fortemente relacionada aos fatores experimentais controláveis (tratamento/tempo) do que às variáveis indeterminadas, ou ao acaso.

Tabela 2. Fontes de variação do teste de letalidade aguda nas espécies *D. rerio* e *A. altiparanae*.

Fonte de variação	<i>D. rerio</i>		<i>A. altiparanae</i>	
	FSG	K ₂ Cr ₂ O ₇	FSG	K ₂ Cr ₂ O ₇
Tratamento	78,68 ^{***}	63,29 ^{***}	90,98 ^{***}	84,84 ^{***}
Tempo	2,41 ^{n.s.}	6,42 ^{n.s.}	1,08 ^{n.s.}	3,83 ^{n.s.}
Total	81,09	69,71	92,06	88,67

n.s. não significativo

*** $p < 0.001$

A dureza média da água de diluição foi de $27,0 \pm 2,0$ mg.L⁻¹ CaCO₃, e os demais parâmetros de qualidade da água estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Variáveis físico-químicas mensuradas nos tratamentos com a fração solúvel da gasolina (FSG) e dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).

		<i>A. Altiparanae</i>			<i>D. rerio</i>		
Tratamento		pH	OD (mg.L ⁻¹)	Temp. (°C)	pH	OD (mg.L ⁻¹)	Temp. (°C)
FSG (% v/v)	Controle aerado	7,1 ± 0,2	6,0 ± 0,4	24,4 ± 0,6	7,6 ± 0,4	7,0 ± 0,8	24,5 ± 0,2
	Controle sem aeração	6,1 ± 0,3	4,0 ± 2,5	24,4 ± 0,7	7,6 ± 0,3	6,0 ± 3,5	24,5 ± 0,1
	6,70	6,2 ± 0,3	4,0 ± 2,1	24,2 ± 0,7	-	-	-
	8,04	6,2 ± 0,2	4,5 ± 1,9	24,1 ± 0,6	-	-	-
	9,65	6,2 ± 0,3	4,1 ± 0,9	24,3 ± 0,9	-	-	-
	11,58	6,2 ± 0,4	4,0 ± 1,0	24,3 ± 0,9	6,8 ± 0,5	4,2 ± 1,0	24,8 ± 0,9
	13,89	6,6 ± 0,3	4,0 ± 0,9	25,0 ± 0,7	7,2 ± 0,5	3,9 ± 0,9	25,0 ± 0,8
	16,67	6,9 ± 0,5	4,0 ± 1,6	25,0 ± 0,9	6,8 ± 0,2	4,1 ± 1,0	24,2 ± 0,7
	20,00	7,0 ± 0,2	4,6 ± 1,5	23,6 ± 0,3	6,7 ± 0,1	3,9 ± 1,0	24,1 ± 0,6
	24,00	-	-	-	6,6 ± 0,3	4,1 ± 1,8	24,2 ± 0,6
	28,80	-	-	-	6,6 ± 0,4	3,9 ± 0,9	24,2 ± 0,8
	34,57	-	-	-	6,7 ± 0,4	4,0 ± 0,9	24,0 ± 0,7
	47,80	-	-	-	7,0 ± 0,2	9,8 ± 0,4	24,0 ± 0,5
	48,23	6,1 ± 0,2	8,9 ± 2,3	25,0 ± 0,7	-	-	-
$K_2Cr_2O_7$ (mg.L ⁻¹)	57,87	6,0 ± 0,2	7,2 ± 1,0	24,4 ± 0,6	-	-	-
	62,15	-	-	-	7,0 ± 0,5	7,0 ± 1,0	24,0 ± 0,8
	69,44	6,1 ± 0,2	6,5 ± 1,5	24,0 ± 0,5	-	-	-
	80,80	-	-	-	6,5 ± 0,6	8,0 ± 0,4	23,7 ± 0,6
	83,33	6,1 ± 0,5	7,6 ± 1,3	25,0 ± 0,9	-	-	-
	100,00	6,0 ± 0,2	7,0 ± 2,0	25,0 ± 0,7	-	-	-
	105,04	-	-	-	6,4 ± 0,7	7,0 ± 0,8	23,9 ± 0,0
	120,00	6,0 ± 0,5	7,1 ± 1,3	25,0 ± 0,9	-	-	-
	136,55	-	-	-	6,3 ± 1,1	7,0 ± 2,0	24,1 ± 0,1
	144,00	6,0 ± 1,1	7,0 ± 0,5	24,3 ± 0,9	-	-	-
	177,50	-	-	-	6,1 ± 1,1	8,3 ± 0,9	24,4 ± 0,5
	230,77	-	-	-	6,1 ± 1,0	7,4 ± 1,0	24,0 ± 0,1

Discussão

Os testes ecotoxicológicos permitem determinar as concentrações dos agentes químicos que causam efeitos danosos aos organismos aquáticos e têm ampla utilização no desenvolvimento de padrões e/ou critérios de qualidade para a proteção das comunidades (Bertoletti, 2000). Várias espécies de peixes de água doce provenientes da Europa, Ásia e América do Norte são padronizadas para os testes de letalidade aguda. No entanto, não existem espécies nativas neotropicais recomendadas para estes testes, que possam ser utilizadas para a proteção dos ambientes aquáticos desta importante região, que apresenta uma das mais diversas ictiofaunas de água doce do mundo, com mais de 8.000 espécies (Schaefer, 1998).

Neste estudo, foi comparada a resposta da espécie exótica padronizada *Danio rerio* com a espécie nativa neotropical *A. altiparanae* em teste de letalidade aguda, com exposição à fração solúvel da gasolina e ao dicromato de potássio. Nossos resultados indicaram que em geral, *A. altiparanae* apresentou maior sensibilidade aos contaminantes em comparação a *D. rerio*.

A contaminação dos ambientes aquáticos por gasolina é frequente, devido à descarga accidental, despejo de efluentes e eventos de derramamentos (Rodrigues *et al.*, 2010), acarretando na solubilização e disponibilização de compostos tóxicos, através da formação da fração solúvel, uma mistura complexa de hidrocarbonetos petrogênicos tóxicos, considerados perigosos contaminantes ambientais (Harvey, 1997).

Entre os hidrocarbonetos da FSG destacam-se os BTEX e os HPAs que apresentam ampla toxicidade e mobilidade ambiental (Deasi *et al.*, 2010; IARC, 2010; Mazzeo *et al.*, 2011). Devido a sua toxicidade, os HPAs são considerados poluentes prioritários pelas agências de proteção ambiental (Joa *et al.*, 2009) e em avaliações de risco ecológico de lançamento de efluentes industriais (Beyera *et al.*, 2010).

A CL₅₀ da FSG para *A. altiparanae* foi de 15% (v/v) e para *D. rerio* foi de 20 % (v/v), e através da análise pareada da letalidade das espécies em cada concentração teste foi verificada diferença significativa de resposta, indicando a maior sensibilidade da espécie nativa neotropical *A. altiparanae*.

Análises da letalidade aguda da FSG são escassas na literatura e os dados existentes não permitem uma comparação direta dos resultados devido às diferenças na concentração de hidrocarbonetos aromáticos das amostras. No entanto, testes

com hidrocarbonetos isolados mostram sua elevada toxicidade. A CL_{50} do benzeno em peixes varia de 5,3 à 15,1 $mg.L^{-1}$, já o naftaleno, um hidrocarboneto policíclico aromático de baixo peso molecular, é ainda mais tóxico, com CL_{50} entre 1,6 à 7,9 $mg.L^{-1}$ (DeGraeve *et al.*, 1982). Os efeitos subletais da fração solúvel de petróleo e derivados incluem alterações fisiológicas, bioquímicas, genéticas e histopatológicas (Akaishi *et al.*, 2004; Pacheco e Santos, 2001).

O dicromato de potássio, utilizado neste estudo, é uma substância referência que permite comparar a sensibilidade interespecífica e intraespecífica (Knie e Lopes, 2004). A CL_{50} do dicromato de potássio nas espécies padronizadas *Pimephales promelas* e *Lepomis macrochirus* é de 173,0 $mg.L^{-1}$ e 320,0 $mg.L^{-1}$ respectivamente, de acordo com dados da ficha de segurança do produto (LabChem, Inc; Carolina Biological Supply Company). E a CL_{50} descrita para peixes neotropicais varia de 130,79 $mg.L^{-1}$ para *Hyphessobrycon eques*; 144,50 $mg.L^{-1}$ para *Piaractus mesopotamicus* e 154,39 $mg.L^{-1}$ para *Phallocerus caudimaculatus* (Cruz *et al.*, 2008). Esses dados evidenciam a ampla variedade de resposta interespecífica e, comparativamente, os peixes utilizados neste estudo são mais sensíveis, devido aos valores obtidos da CL_{50} , sendo de 84 $mg.L^{-1}$ para *D. rerio* e 75 $mg.L^{-1}$ para *A. altiparanae*. No entanto, não foi observada diferença significativa entre as duas espécies testadas.

Entre as características que determinam a escolha de um organismo teste, a sensibilidade apresenta alta relevância ecológica, principalmente na avaliação de risco ambiental, para o monitoramento e predição dos efeitos de contaminantes no ambiente aquático (Knie e Lopes, 2004; Connon *et al.*, 2012). Além disso, a sensibilidade dos organismos é um fator determinante do impacto ambiental, assim como a intensidade e frequência da exposição (Connon *et al.*, 2012).

A espécie *A. altiparanae* apresentou maior sensibilidade nos tratamentos com a FSG e similaridade de resposta na exposição ao dicromato de potássio em comparação ao *D. rerio*. Além disso, nos testes com *A. altiparanae* foi observada maior correlação dose-resposta e menor influência de fatores experimentais não controláveis nos resultados, podendo ser considerada um bom organismo teste.

A. altiparanae é uma espécie endêmica do Alto Paraná, podendo ser considerada componente chave da biodiversidade desta região, desta forma, estudar os efeitos tóxicos em organismos endêmicos é essencial a preservação, não apenas da espécie alvo, mas também dos organismos associados.

Devido à sua distribuição restrita, a espécie não pode ser recomendada como organismo teste em toda a região Neotropical. No entanto, existe uma grande variedade de espécies do gênero *Astyanax* que poderiam ser avaliadas para este fim.

O ponto principal deste trabalho é sugerir que espécies nativas sejam aplicadas em testes nas suas regiões para compreensão realística do impacto em cada localidade. De acordo com Martins e Bianchini (2011), os testes de toxicidade são mais úteis quando se utilizam espécies locais. Estas espécies são representativas do ecossistema em estudo e apresentam uma importante função ecológica. Além disso, é importante a realização de testes de toxicidade com espécies sensíveis ao poluente selecionado, assegurando assim a proteção de toda a comunidade.

As variáveis físico-químicas devem atender aos padrões exigidos para assegurar a qualidade da água e obter resultados confiáveis nos testes ecotoxicológicos. A água utilizada neste trabalho é classificada como mole em relação à dureza e a concentração de CaCO_3 obtida está na faixa aceitável (10 a 250 mg.L^{-1}) de acordo com o protocolo da Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 1992).

Os valores de pH, oxigênio dissolvido e temperatura da água estão de acordo com os padrões estabelecidos para testes de letalidade aguda com peixes de água doce (OECD, 1992; US EPA, 1996; US EPA 2002; ABNT, 2011).

Os parâmetros avaliados foram mantidos estáveis durante o experimento, exceto a concentração de oxigênio dissolvido (OD), que teve variação com decréscimo nos tratamentos com a FSG devido à ausência de aeração. No entanto, após a renovação da solução-teste com água saturada de oxigênio foi possível manter as condições aceitáveis. Esse decréscimo de OD provavelmente não interferiu nos resultados do teste, visto que não houve letalidade nos indivíduos do tratamento controle não-aerado ($\text{OD} = 4,0 \pm 2,5$). Em geral, apenas concentrações menores que 3,0 mg.L^{-1} de OD podem causar letalidade em peixes (Boyd, 1982).

Considerações finais

Concluimos que a espécie nativa neotropical *Astyanax altiparanae* responde de forma eficaz ao teste de toxicidade aguda, com resultados similares à espécie padronizada *Danio rerio* em exposição ao dicromato de potássio e maior sensibilidade à exposição à fração solúvel da gasolina. A espécie *A. altiparanae* também apresentou

maior correlação dose-resposta e menor influencia de fatores não controláveis, podendo ser considerada um bom organismo teste.

O uso de espécies exóticas padronizadas em testes ecotoxicológicos, que apresentem maior resistência, pode subestimar os riscos reais de exposição à xenobióticos em espécies nativas com maior sensibilidade. Assim, tendo em vista a grande variedade de ecossistemas aquáticos, sugere-se o uso de espécies locais para uma melhor investigação de impacto ambiental em diferentes regiões do mundo.

Referências

Abell R, Thieme ML, Revenga C, *et al.* (2008) Freshwater Ecoregions of the World: A new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *Bioscience* 58:403-414.

ABNT, Associação brasileira de normas técnicas (2011) Aquatic ecotoxicology, acute toxicity, test with fish (NBR 15088), 22p.

Akaishi FM, Silva de Assis HC, Jakobi SCG, Eiras-Stofella DR, St-Jean SD, Courtenay SC, Lima EF, Wagener ALR, Scofield AL, Oliveira Ribeiro CA (2004) Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:244–253.

Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, Hightower GM (1974) Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Mar Biol* 27:75–88.

Andrade VM, de Freitas TRO, da Silva J (2004) Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat Res* 560:57–67.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2001) Standard practice for manual sampling of petroleum and petroleum products, (D 4057). Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, pp. 715-732.

Benincá C, Ramsdorf W, Vicari T, Oliveira Ribeiro CA, Almeida ML, Silva de Assis HC, Cestari MM (2012) Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast-Southern of Brazil. *Environ Monit Assess* 184:2045–2056.

Bertoletti, E (2000) Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces: Cyprinidae). Tese em Saúde Ambiental. Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 117 p.

Beyera J, Jonsson G, Porte C, Krahn MM, Ariese F (2010) Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 30:224–244.

Boyd CE (1982) Water quality management for pondfish culture. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 318 p.

Çavaş T, Garanko NN, Arkhipchuk VV (2005) Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem Toxicol* 43:569–74.

Cestari MM, Lemos PMM, Oliveira Ribeiro CA, Costa JRMA, Pelletier E, Ferraro MVM, Mantovani MS, Fenocchio AS (2004) Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genet Mol Biol* 27:270–274.

Clemente Z, Busato RH, Oliveira Ribeiro CA, Cestari MM, Ramsdorf WA, Magalhães VF, Wosiack AC, Silva de Assis HC (2010) Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. *Toxicon* 55:396–406.

Connon RE, Geist J, Werner I (2012) Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors* 12:12741–12771.

Deasi SR, Verlecar XN, Ansari ZA, Jagtap TG, Sarkar A, Vashistha D, Dalal SG (2010) Evaluation of genotoxic responses of *Chaetoceros tenuissimus* and *Skeletonema costatum* to water accommodated fraction of petroleum hydrocarbons as biomarker of exposure. *Water Res* 44:2235–2244.

DeGraeve GM, Elder RG, Woods DC, Bergman HL (1982) Effects of naphthalene and benzene on Fathead Minnows and Rainbow Trout. *Arch Environm Contam Toxicol* 11:487–490.

Eigenmann CH (1921) The American Characidae. *Mem Mus Comp Zool* 43: 209–310.

Erbe MCL, Ramsdorf WA, Vicari T, Cestari MM (2011) Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 20:320–8.

FEOW, Freshwater Ecoregions of the World. Disponível em <http://www.feow.org/> Acessado em 23 de junho de 2015.

Ferraro MVM, Fenochio AS, Mantovani MS, Cestari MM, Oliveira Ribeiro CA (2004) Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated of using the Comet assay, piscine micronucleus and chromosome aberrations tests. *Genet Mol Biol* 27:103–107.

Galindo TP, Moreira LM (2009) Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator*. Genet Mol Biol 398:394–398.

Garutti V, Britski HA. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia (2000) Comun Mus Ciênc Tecnol PUCRS, Sér Zool, Porto Alegre, 13:65-88.

Ghisi N de C, Cestari MM (2013) Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. Environ Monit Assess 185:3201–3207.

Harvey, RG Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Wiley, New York, NY, 1997. In: Beyera J, Jonsson G, Porte C, Krahn MM, Ariese F (2010) Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. Environ Toxicol Pharmacol 30:224–244.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2010) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, World Health Organization (WHO), v. 92, Lyon, France, ISBN 978 92 832 1292 8.

ISO, International Organization for Standardization (2011) Water quality -- Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water -- Method using gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS) - ISO 28540, 27p.

Joa K, Panova E, Irha N, Teinemaa E, Lintelmann J, Kirso U (2009) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oil shale processing wastes: current practice and new trends. Oil Shale 26:59-72.

Knie JLW, Lopes EWB (2004) Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 289p.

Lawrence C (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. Aquaculture 269:1–20.

Leuzzi MSP, Almeida FS, Orsi ML, Sodr  LMK (2004) Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. Genet Mol Biol 27:355–362.

Liebel S, Oliveira Ribeiro CA, Silva RC, Ramsdorf WA, Cestari MM, Magalhães VF, Garcia JRE, Esquivel BM, Filipak Neto F (2011) Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. Toxicol Vitro 25:1493–1500.

Martins SE, Bianchini A (2011) Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. J Environ Monit 13:1866–1875.

Matsumoto FE, Cólus IMS (2000) Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genet Mol Biol* 492:489–492.

Mazzeo DEC, Fernandes TCC, Marin-Morales MA (2011) Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. *Chemosphere* 85:13–18.

Mela M, Guiloski IC, Doria HB, Randi MAF, Oliveira Ribeiro CA, Pereira L, Maraschi AC, Prodocimo V, Freire CA, Silva de Assis HC (2013) Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol Environ Saf* 93:13–21.

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development (1992) Guideline for testing of chemicals. Fish, acute toxicity test, Part 203, 9p.

Oliveira Ribeiro CA, Katsumiti A, França P, Maschio J, Zandoná E, Cestari MM, Vicari T, Roche H, Silva de Assis HC, Filipak Neto F (2013) Biomarkers responses in fish (*Atherinella brasiliensis*) of paranaguá bay, southern Brazil, for assessment of pollutant effects. *Braz J Oceanogr* 61:1–11.

Osório FHT, Silva LFO, Piancini LDS, Azevedo ACB, Liebel S, Yamamoto FY, Philippi VP, Oliveira MLS, Ortolani-Machado CF, Neto FF, Cestari MM, Silva de Assis HC, Oliveira Ribeiro (2013) Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environ Sci Pollut Res* 21:9145-9160.

Pacheco M, Santos M (2001) Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 49:64–75.

Pamplona JH, Oba ET, Silva TA, Ramos LP, Ramsdorf WA, Cestari MM, Oliveira Ribeiro CA, Zampronio AR, Silva de Assis HC (2011) Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Ecotox Environ Saf* 74:342–349.

Ramsdorf WA (2011) Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes. Tese em Genética, UFPR, Curitiba, 178p.

Ramsdorf WA, Ferraro MVM, Oliveira-Ribeiro CA, Costa JRM, Cestari MM (2009) Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environ Monit Assess* 158:77–85.

Ramsdorf WA, Vicari T, de Almeida MIM, Artoni RF, Cestari MM (2012) Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environ Monit Assess* 184:5841–5849.

Ribeiro DL, Barcelos GRM, d'Arce LPG (2014) Genotoxic effects of water from São Francisco River, Brazil, in *Astyanax paranae*. *Bull Environ Contam Toxicol* 93:274–279.

Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA (2010) Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci Total Environ* 408:2054–2059.

Rossi SC, Silva MD, Piancini LDS, Oliveira Ribeiro CA, Cestari MM, Silva de Assis HC (2011) Sublethal effects of waterborne herbicides in tropical freshwater fish. *B Environ Contam Tox* 87:603-607.

Santos DM, Santos GS, Cestari MM, Oliveira Ribeiro CA, Silva de Assis HC, Yamamoto F, Guiloski IC, Marchi MRR, Montone RC (2014) Bioaccumulation of butyltins and liver damage in the demersal fish *Cathorops spixii* (Siluriformes, Ariidae). *Environ Sci Pollut Res Int* 21:3166–3174.

Schaefer SA (1998) Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds.) *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.

Silva RRP, Pires OR, Grisolia CK (2010) Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. *Genet Mol Biol* 33:750–755.

US EPA: United States Environmental Protection Agency (1994) Using toxicity tests in ecological risk assessment. *ECO Update, Intermittent Bulletin*, EPA, Washington, Vol 2, N° 1, 12p.

US EPA: United States Environmental Protection Agency (1996) Ecological effects test guidelines. Fish acute toxicity test, freshwater and marine, EPA, Washington, 11p.

US EPA: United States Environmental Protection Agency (2002) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5th edition, EPA, Washington, 266p.

Vanzella TP, Martinez CBR, Cólus IMS (2007) Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a Neotropical fish species. *Mutat Res* 631:36–43.

Vicari T, Ferraro MVM, Ramsdorf WA, Mela M, Oliveira Ribeiro CA, Cestari MM (2012) Genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH₃Hg⁺) in *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 82:47–55.

Vieira CED, Almeida MDS, Galindo BA, Pereira L, Martinez CBR (2014) Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotrop Ichthyol* 12:153–164.

CAPÍTULO 3

Análise genotóxica eritrocítica e hematológica leucocitária em *Astyanax altiparanae* (Characidae) após períodos de exposição e depuração da fração solúvel da gasolina (FSG)

Resumo

A gasolina é uma mistura de hidrocarbonetos tóxicos com potencial de impacto nos ambientes aquáticos através diversas fontes de contaminação. Neste trabalho foram avaliados os efeitos tóxicos da exposição de peixes à fração solúvel da gasolina (FSG) e o potencial de recuperação dos organismos após períodos de depuração, a fim de determinar se possíveis efeitos induzidos podem revertidos. Foram utilizados como biomarcadores o teste do micronúcleo pisco como indicador de genotoxicidade e a contagem diferencial das células de defesa orgânica como um indicador hematológico. O ensaio foi realizado com exposição aguda à FSG 1,5% (v/v), seguida por depuração gradual e total. A exposição aguda à FSG induziu apenas o aumento da frequência de neutrófilos. No período de depuração gradual houve aumento da frequência de trombócitos e anomalias nucleares em eritrócitos. Após os períodos de depuração total, houve redução de anomalias nucleares, mas a frequência de trombócitos se manteve alta e foi evidenciado aumento no número de linfócitos, indicando uma resposta à condição de estresse a longo prazo.

Palavras-chave: teste do micronúcleo, hidrocarbonetos, ecotoxicologia.

Introdução

A gasolina é um dos múltiplos compostos relacionados às atividades antrópicas com potencial de impacto ecológico em ambientes aquáticos através da contaminação por derramamentos acidentais, infiltrações de tanques subterrâneos de armazenamento (Corseuil *et al.*, 1997) e efluentes de postos de gasolina e refinarias, que mesmo após tratamento prévio mantém resíduos tóxicos, incluindo agentes genotóxicos (Avci *et al.*, 2005; Hoshina e Marin-Morales, 2009; Oliveira-Martins e Grisolia, 2009).

Devido à sua característica hidrofóbica, os hidrocarbonetos aromáticos presentes na gasolina são alocados na superfície ou adsorvidos no sedimento (Chen *et al.* 2004; Froehner *et al.*, 2010), no entanto, parte desses compostos são solubilizados na coluna da água ficando biodisponíveis para os organismos e são rapidamente bioacumulados (Gravato e Santos, 2002) e biomagnificados (Froehner *et al.*, 2011). Essa fração solúvel é composta por hidrocarbonetos aromáticos que incluem dois grupos ecotoxicologicamente relevantes, os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Pacheco e Santos, 2001).

Grandes quantidades de hidrocarbonetos de petróleo e compostos derivados contaminam rios de regiões tropicais (Akaishi *et al.*, 2004; Leme *et al.*, 2008), tendo consequências severas para o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (dos Anjos *et al.*, 2011). Entretanto, poucos estudos ecotoxicológicos são realizados com peixes dessas regiões (Akaishi *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2007). Desta forma, neste estudo foi utilizado o peixe Neotropical *Astyanax altiparanae* (Characidae) como bioindicador de exposição à fração solúvel da gasolina (FSG). O gênero *Astyanax* é considerado um bom bioindicador (Silva *et al.*, 2010; Ramsdorf *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2014), apresenta ampla distribuição geográfica (Garutti and Britski 2000), sendo o mais representativo da subfamília Tetragonopterinae (Eigenmann 1921).

Para avaliar o risco de exposição dos organismos à xenobióticos são utilizados biomarcadores, entre eles o teste do micronúcleo písceo (MNT) é um dos mais utilizados para investigação de efeitos genotóxicos de poluentes em peixes (Al-Sabti, 1986). Os parâmetros hematológicos são também importantes biomarcadores, visto que podem ser significativamente alterados em resposta à exposição a xenobióticos (Modesto e Martinez, 2010), sendo frequentemente utilizados para

avaliar a saúde de peixes (Martinez e Souza, 2002) e para a detecção de fisiopatologias sob diferentes condições de estresse (Nussey *et al.*, 1995) e como indicador de resposta imune não específica (Tavares-Dias e Moraes 2004; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2006).

Além da avaliação dos efeitos de exposição a poluentes, os estudos de depuração são importantes para verificar se o organismo pode reestabelecer suas condições normais após ter cessado a condição de estresse. Essas informações podem ser aplicadas em estudos de efeitos de xenobióticos (Ansari e Kumar 1984; Sancho *et al.*, 2000; Adhikari *et al.*, 2004; Hasue *et al.*, 2013) e em análises de risco ecológico (US EPA, 1998; Boesten *et al.*, 2007) para o manejo e recuperação de áreas degradadas.

Desta forma, neste estudo foram avaliados os efeitos genotóxicos e alterações leucocitárias da fração solúvel da gasolina em *A. Altiparanae* após períodos de exposição e depuração, para determinar se efeitos induzidos pelo xenobiótico são passíveis de reversão.

Material e Métodos

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, certificado nº688. As amostras de gasolina foram coletadas em frascos âmbar de 1 litro (ASTM, 2001) em postos de combustíveis aleatorizados do estado do Paraná, Brasil e foram homogeneizadas.

A fração solúvel da gasolina (FSG) foi preparada misturando-se uma parte de gasolina em nove partes de água destilada (1:9), e em seguida foi submetida à rápida agitação durante 20 horas. Decorrido este período, as amostras ficaram em repouso por 30 minutos. A fase insolúvel foi descartada e a fração solúvel da gasolina (100%) foi utilizada para a realização dos testes (Pacheco e Santos, 2001).

A concentração da fração solúvel utilizada no ensaio subletal foi determinada a partir da concentração de efeito não observado (CENO) que foi obtida através de teste de letalidade aguda, realizado de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 1996) com modificações. Foram testadas as seguintes concentrações da FSG (% v/v): 25,0%; 16,7%; 10,0%; 6,7%; 5,0%; 4,0%; 3,0% e 1,5%. Para cada tratamento foram utilizados seis indivíduos de *Astyanax altiparanae*, os quais ficaram individualizados em aquários contendo um litro de solução em sistema

estático e sem aeração. O controle negativo foi realizado sob as mesmas condições. A CENO obtida foi de 1,5% (v/v) da FSG, concentração que não produziu efeito letal em 96 horas de exposição.

No ensaio subletal foram utilizados 20 peixes por tratamento, em densidade de estocagem menor que 1g.L^{-1} . Todos os peixes foram distribuídos aleatoriamente em aquários de 108 litros e foram expostos à FSG ao mesmo tempo.

Foi realizado um tratamento de exposição aguda (96 h) à FSG 1,5% (v/v), sem aeração em sistema semi estático com renovação de 25% da solução teste a cada 24 horas (OECD 1992), decorrido o período de 96 horas, foram amostrados vinte peixes, este tratamento foi denominado de FSG (96h). Os tratamentos de recuperação foram realizados com os peixes remanescentes que passaram pelo tratamento FSG (96 h), sendo feito um tratamento de depuração gradual (DG), um tratamento de depuração total de 15 dias (DEP 15) e de depuração total de 30 dias (DEP 30). O tratamento DG foi realizado com 7 dias de exposição à FSG 1,5% (v/v), com renovação diária de 25% do volume do aquário com a FSG, seguido por 8 dias com renovação de 25% do volume do aquário com água filtrada, completando 15 dias de ensaio. Após este período, os demais indivíduos foram transferidos para aquários com água totalmente limpa e amostrados em 15 dias e 30 dias, sendo os tratamentos DEP 15 e DEP 30 respectivamente. A água utilizada nos ensaios foi previamente filtrada e decolorada por aeração.

As variáveis de pH, oxigênio dissolvido e temperatura da água foram mensuradas a cada 24 horas com medidor digital (Lutron DO5510). A dureza (SM, 2005a) foi analisada na água de diluição (OECD, 1992). Os hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) foram quantificados por cromatografia gasosa/detector de ionização de chama (DIN, 1991) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram analisados por cromatografia gasosa/espectrômetro de massas (SM, 2005b).

O sangue foi coletado por punção cardíaca com tubo capilar heparinizado e imediatamente foi realizado o esfregaço. As lâminas foram preparadas de acordo com Vicari *et al.* (2012) com as seguintes modificações: etanol 96% por 30 minutos e coradas com Giemsa (10%) diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 12 minutos, enxaguadas com água corrente e secas ao ar.

No teste do micronúcleo písceo (MNT) foram analisadas as anomalias nucleares, classificadas de acordo com Carrasco *et al.* (1990) em eritrócitos micronucleados (MN), blebbed (BL), lobed (LB), vacuolated (VC) e notched (NT). Além

dessas anormalidades foram observadas células binucleadas (BN) de acordo com Çavaş and Ergene-Gözükara (2005b). Foram analisados 2000 eritrócitos por lâmina (Amado *et al.*, 2006; Caliani *et al.*, 2009; Ramsdorf *et al.*, 2009; Vicari *et al.*, 2012) e os resultados expressos como frequência de cada anomalia nuclear em 1000 células (‰) (Çavaş e Ergene-Gözükara, 2003).

A análise hematológica foi realizada através da contagem diferencial das células sanguíneas de defesa orgânica (Tavares-Dias *et al.*, 2003). Foram analisados trombócitos e leucócitos, este último subdividido em neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos, monócitos e leucócito granular PAS-positivo (GL-PAS). Além dessas células, foi incluída a análise de mastócitos. Foram analisadas 1000 células nas bordas e 1000 células a partir do centro das extensões sanguíneas, incluindo eritrócitos (Pádua *et al.*, 2009).

Análise estatística

A comparação entre dois tratamentos (controle negativo X tratamento com a FSG) foi realizada através do teste de Mann-Whitney. Para a comparação entre múltiplos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls. A comparação entre as frequências das anomalias nucleares dentro de cada tratamento foi realizada através do teste de Wilcoxon. A concentração de hidrocarbonetos aromáticos entre o tempo 0 horas e os demais períodos foi comparada através do teste t-pareado. Em todas as análises o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados e discussão

A dureza da água foi de $27,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, temperatura ($23,4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,8$), pH ($6,6 \pm 0,7$) e oxigênio dissolvido ($7,4 \pm 2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), estando de acordo com os padrões estabelecidos para testes com peixes (OECD, 1992).

Os BTEX foram os compostos mais abundantes na FSG (Tabela 1) e deve-se ao fato de que são os hidrocarbonetos aromáticos mais abundante na gasolina (Adami *et al.*, 2006) e são mais solúveis do que os HPAs (Desai *et al.*, 2010). Após derramamentos e vazamentos no ambiente, os BTEX são os compostos mais propensos a alcançar reservatórios de água e causar vários tipos de danos aos organismos em habitats aquáticos (Bücker *et al.*, 2012).

As concentrações de HPAs obtidos nas amostras da FSG são ecologicamente relevantes devido à similaridade com o descrito em ambientes aquáticos em várias partes do mundo. Em efluentes de perfuração de poços de petróleo em terra e em áreas contaminadas pelo vazamento de oleodutos foram obtidas concentrações de HPAs correspondentes aos obtidos na FSG 100% (Leme e Marin-Morales, 2008; Caliani *et al.*, 2009). Além das concentrações na coluna de água, grandes quantidades destes compostos são encontradas em sedimentos (Manoli *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004), indicando que a saúde dos organismos aquáticos está em risco devido à exposição contínua a concentrações altamente tóxicas de HPAs.

A concentração nominal de 1,5% (v/v) foi equivalente à concentração efetiva, mantendo a exata proporção de aromáticos do período inicial (0 h), mas após 96 horas houve um decréscimo significativo dos hidrocarbonetos, mesmo com a renovação da solução teste. A perda de hidrocarbonetos é associada especialmente a volatilização mas também à foto-oxidação (Abrajano Jr. e Yan 2005) e assimilação pelos peixes (Meador *et al.*, 1995).

Tabela 1. Concentração de hidrocarbonetos aromáticos na fração solúvel da gasolina e porcentagem de perda.

Concentração nominal	100%	1,5%	1,5%	1,5%	DG
Período	0h	0h	96h	8d	15d
BTEX($\mu\text{g.L}^{-1}$)	78921,40	1141,10	96,30	34,90	0,00
HPAs ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	147,74	10,79	1,80	1,75	0,26
Perda (%)	-	0,00	91,48*	96,82*	99,98*

DG depuração gradual; * diferença significativa em comparação ao tratamento 1,5% (v/v) da FSG em 0 hora.

Através do teste do micronúcleo písceo foi avaliada a frequência anomalias nucleares (Figura 1). Notched (NT) foi a anomalia mais frequente diferindo das demais dentro dos tratamentos, incluindo no controle negativo, indicando que o organismo apresenta um nível basal desse tipo de alteração, mas que também pode ser induzida pela contaminação com a FSG. As frequências das demais anomalias não diferiram entre si. A alteração LB não foi observada (Tabela 2).

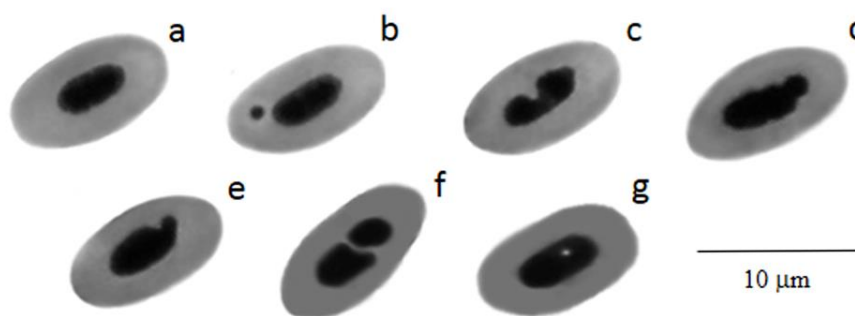


Figura 1. Eritrócitos periféricos de *A. altiparanae*: a) normal; b) micronúcleo (MN); c) notched (NT); d) lobed (LB); e) blebbed (BL); f) binúcleo (BN); g) vacuolated (VC). Aumento de 1000x.

Tabela 2. Frequência de anomalias nucleares (‰AN) de *A. altiparanae* após períodos de exposição à fração solúvel da gasolina (FSG) e subsequente depuração.

AN	CN	FSG (96 h)	DG	DEP 15	DEP 30
BL	0,0 (0,0-0,7)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-2,0)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-0,5)
VC	0,0 (0,0-2,0)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-1,5)	0,0 (0,0-0,5)	0,0 (0,0-0,0)
BN	0,0 (0,0-0,7)	0,0 (0,0-0,5)	1,0 (0,0-3,0) *	0,0 (0,0-4,5)	0,0 (0,0-0,5) ^α
NT	0,3 (0,0-4,5) ^β	1,0 (0,0-4,0) ^β	1,8 (0,1-10,5) * ^β	1,0 (0,0-11,5) ^β	0,0 (0,0-4,9) ^{α β}
MN	0,0 (0,0-1,4)	0,0 (0,0-1,5)	0,0 (0,0-1,5)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-0,0)
Σ	1,0 (0,0-6,5)	1,0 (0,0-4,0)	2,8 (0,0-16,5) *	1,0 (0,0-18,0)	0,0 (0,0-4,9) ^α

Dados apresentados como mediana, valores mínimo e máximo, Med (Min.-Max.); AN anomalias nucleares: BL blebbed; VC vacuolated; BN binucleada; NT notched; MN micronúcleo; CN controle negativo; FSG (96 h) período de exposição de 96 horas à FSG 1,5% (v/v); DG depuração gradual; DEP 15 depuração por 15 dias em água limpa; DEP 30 depuração por 30 dias em água limpa. * diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$); ^α diferença significativa entre os períodos de depuração total e o tratamento DG ($p < 0,05$); ^β diferença significativa entre as anomalias nucleares dentro de cada tratamento.

A exposição aguda (96h) não induziu aumento de anomalias nucleares. No tratamento DG, com duração de 15 dias, houve aumento na frequência das alterações do tipo binúcleo e notched e no total de anomalias nucleares. A formação de células binucleadas é um indicador de dano citogenético, que pode resultar no desequilíbrio das células, e está envolvida no processo de carcinogênese (Çavaş *et al.*, 2005). A alteração notched apresenta uma perda de material nuclear (Ayllón e Garcia-Vazquez, 2001), sendo associada com aneuploidia (Ghadially, 1982).

Não houve indução de MN em nenhum tratamento. O tempo de exposição é um fator importante para a detecção de MN, como demonstrado por Bückner *et al.* (2006) em que a exposição de peixes ao benzeno induziu a frequência de MN em 48h com sucessiva redução em 96 h e 15 d de exposição. A indução de MN em peixes

expostos aos hidrocarbonetos aromáticos também pode ser dependente da dose/concentração. Efeitos dose-resposta de indução de MN foram observados em peixes expostos ao benzo(a)pireno (Deguchi *et al.*, 2007). Além disso, em baixas doses pode haver aumento de alterações morfológicas nucleares e com o aumento da dose há indução de MN (Bücker *et al.*, 2012).

Resultados similares, em que não foram induzidos MN apenas AMN, foram obtidos em peixes expostos à efluentes de postos de combustível (Oliveira-Martins e Grisolia, 2009). Embora o mecanismo de formação de alterações morfológicas nucleares não seja elucidado, eles estão associados a efeitos genotóxicos de xenobióticos (Çavaş e Ergene-Gözükara 2005a).

Nos períodos de depuração foi observada normalização gradual das condições celulares, mas a frequência das alterações só foi reduzida significativamente em comparação a DG após 30 dias de depuração (α). A genotoxicidade pode ser reduzida quando o organismo é exposto a baixas concentrações de hidrocarbonetos, mas em concentrações elevadas a indução de dano severo compromete o processo de reparo do DNA (Hasue *et al.*, 2013). No entanto, a normalização da frequência de AN não depende do reparo do DNA da célula madura, e sim do processo de renovação celular e da capacidade do tecido hematopoiético em produzir eritrócitos normais que podem ser detectados no sangue periférico.

As células do sangue periférico de *A. altiparanae* estão apresentadas na Figura 2. Na frequência basal mediana, os eritrócitos corresponderam a 99,4% das células, seguido pelos leucócitos (0,5%), mastócitos (0,1%) e trombócitos (0,0%). A frequência de trombócitos aumentou nos tratamentos DG, DEP 15 e DEP 30 (Tabela 3). Essas células promovem a coagulação sanguínea (Clauss *et al.*, 2008) e estão envolvidas no processo de defesa orgânica e no controle da homeostase (Veiga *et al.*, 2000).

Em relação a contagem diferencial de leucócitos foi observado aumento na frequência de neutrófilos em 96h de exposição à FSG com normalização nos períodos de depuração (Tabela 4). Os neutrófilos são os granulócitos mais comuns em teleósteos, sendo encontrados no sangue periférico em estágio imaturo (Clauss *et al.*, 2008). São os primeiros leucócitos a migrar na defesa contra parasitas (Rahkonen e Pasternack 1998) e atuam na resposta inflamatória. Além disso, alterações na

frequência dessas células podem ocorrer em condições de estresse (Davis *et al.*, 2008).

No tratamento DEP 30 houve um aumento significativo de linfócitos, essas células estão envolvidas na regulação do sistema imunológico, com a produção de imunoglobulinas e modulação defesa (Iwama, 1996). A exposição a poluentes, muitas vezes leva à diminuição na porcentagem de linfócitos e aumento de neutrófilos (Wieteska, 2005). No entanto, neste trabalho, a frequência de neutrófilos foi aumentada após 96 horas de exposição a FSG sem alterar o número de linfócitos, que só tiveram aumento significativo após 30 dias de depuração.

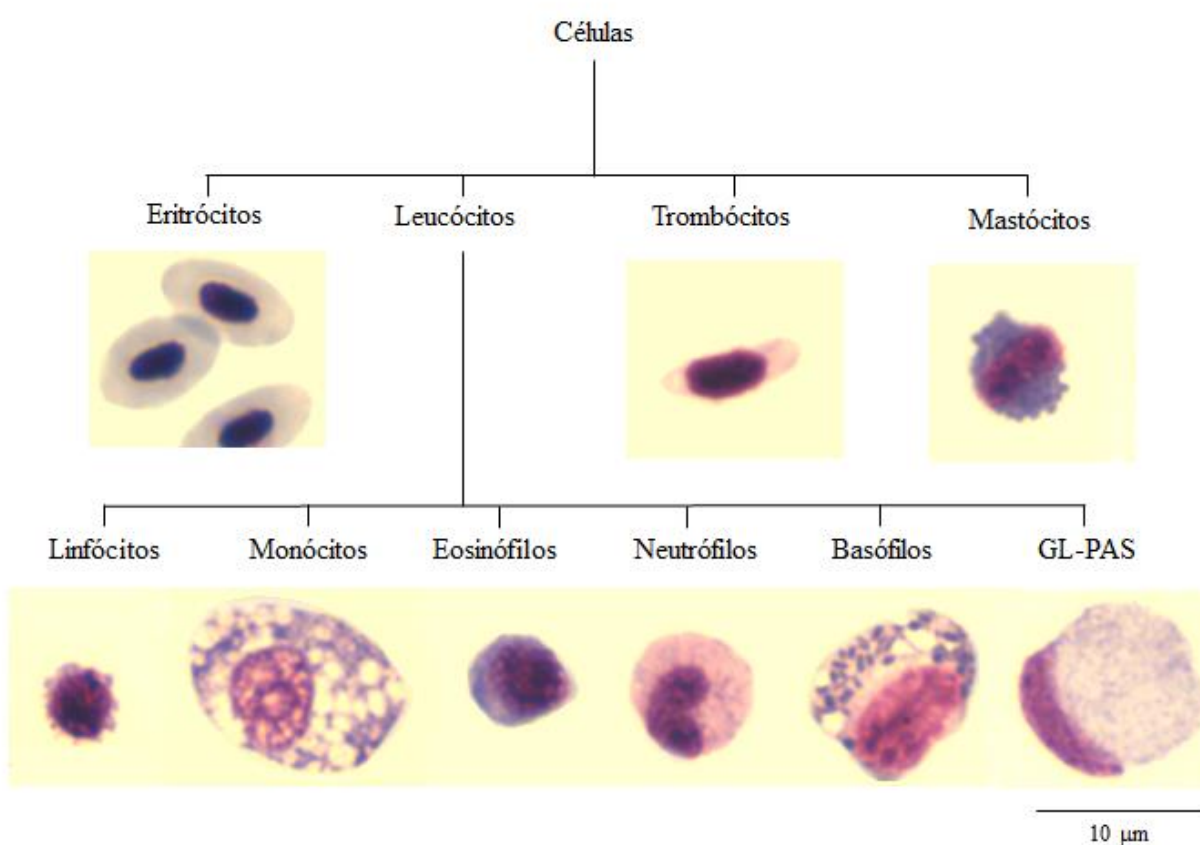


Figura 2. Células do sangue periférico de *A. altiparanae*. Aumento de 1000x.

Tabela 3. Células do sangue de *A. altiparanae* após períodos de exposição e depuração à FSG.

Dados apresentados como mediana, valores mínimo e máximo, Med (Min,-Max.); FSG (96 h) exposição por 96 horas à FSG 1,5% (v/v); DG depuração gradual; DEP

Células (%)	Controle	FSG (96 h)	DG	DEP 15	DEP 30
Eritrócitos	99,4 (98,9-99,9)	99,2 (95,7-99,9)	99,0 (97,0-99,8)	99,4 (96,5-99,8)	99,3 (98,0-99,8)
Leucócitos	0,5 (0,1-1,1)	0,8 (0,1-1,9)	0,8 (0,1-2,7)	0,5 (0,1-3,5)	0,6 (0,2-1,9)
Trombócitos	0,0 (0,0-0,4)	0,0 (0,0-0,3)	0,2 (0,0-0,8) *	0,1 (0,00-0,5) *	0,1 (0,0-0,6) *
Mastócitos	0,1 (0,0-0,1)	0,0 (0,0-0,4)	0,0 (0,0-0,3)	0,0 (0,0-0,8)	0,0 (0,0-0,4)

15 depuração total por 15 dias; DEP 30 depuração total por 30 dias; * diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).**Tabela 4.** Contagem diferencial leucocitária em *A. altiparanae* após períodos de exposição e depuração à FSG.

Dados apresentados como mediana, valores mínimo e máximo, Med (Min,-Max.); FSG (96 h) exposição por 96 horas à FSG 1,5% (v/v); DG depuração gradual; DEP

Células (%)	Controle	FSG (96 h)	DG	DEP 15	DEP 30
Linfócitos	37,6 (0,0-75,0)	38,2 (0,0-100,0)	35,3 (0,0-86,7)	50,0 (0,0-100,0)	57,1 (28,6-100,0) *
Monócitos	11,0 (0,0-64,7)	7,2 (0,0-50,0)	4,5 (0,0-85,2)	5,0 (0,0-100,0)	0,0 (0,0-42,9)
Eosinófilos	7,0 (0,0-80,0)	10,0 (0,0-64,0)	1,9 (0,0-66,7)	0,0 (0,0-57,1)	0,0 (0,0-33,3)
Neutrófilos	9,8 (0,0-66,7)	27,0 (0,0-68,8) *	6,7 (0,0-75,0)	4,2 (0,0-94,3)	13,9 (0,0-60,7)
Basófilos	2,4 (0,0-33,3)	2,0 (0,0-21,1)	0,0 (0,0-57,1)	0,0 (0,0-27,3)	5,6 (0,0-33,3)
GL-PAS	0,0 (0,0-33,3)	0,0 (0,0-6,3)	0,0 (0,0-14,3)	0,0 (0,0-8,6)	0,0 (0,0-11,1)

15 depuração total por 15 dias; DEP 30 depuração total por 30 dias; * diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

Os efeitos observados nos períodos de depuração podem ser associados a respostas adaptativas, já que os peixes podem apresentar recuperação, dependendo da duração e magnitude do estresse (Trujillo-Jiménez *et al.*, 2011), mas se a condição de estresse é muito intensa ou persistente os peixes são incapazes de recuperar a homeostase e as respostas podem tornar-se mal adaptativas e colocar a saúde e o bem-estar dos organismos em risco (Barton, 2002).

A frequência de células brancas do sangue pode ser alterada em resposta a vários fatores ambientais e fisiológicos (Modesto e Martinez, 2010) e as alterações induzidas por poluentes podem ser associados com a diminuição da imunidade não específica de peixes (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2006).

A FSG, mesmo com baixas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos, foi capaz de induzir efeitos tóxicos como genotoxicidade e alterações hematológicas. A depuração pode promover a recuperação de alguns parâmetros, tais como a normalização de alterações nucleares. No entanto, alguns efeitos como aumento do número de linfócitos e trombócitos são evidenciados mesmo após prolongado período de depuração (30 dias). Assim, podemos concluir que a FSG altera o estado fisiológico normal com respostas de longo prazo que podem ter implicações para a saúde dos peixes, sendo um fator preocupante devido à ampla distribuição de hidrocarbonetos aromáticos em diferentes ambientes.

Referências

- Abrajano Jr. TA, Yan B (2005) High molecular weight petrogenic and pyrogenic hydrocarbons in aquatic environments. In: Lollar BS (Ed.) Environmental geochemistry, 1st edn. Elsevier, Oxford, pp 475-509.
- Adami G, Larese F, Venier M, Barbieri P, Lo Coco F, Reisenhofer E (2006) Penetration of benzene, toluene and xylenes contained in gasolines through human abdominal skin in vitro. *Toxicol in Vitro* 20:1321–1330.
- Adhikari S, Sarkar B, Chatterjee A, Mahapatra CT, Ayyappan S (2004) Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicol Environ Saf* 58:220–6.
- Akaishi FM, Silva de Assis HC, Jakobi SCG et al (2004) Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water-soluble fraction (WSF) of crude oil. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:244 –253.

Al-Sabti K (1986) Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp Biochem Physiol C*, 85:5-9.

Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, Hightower GM (1974) Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Mar Biol* 27:75–88.

Ansari BA, Kumar K (1984) Malathion toxicity: in vivo inhibition of acetylcholinesterase in the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *Toxicol Lett* 20:283–287.

Ayllón F, Garcia-Vazquez E (2001) Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environ Saf* 49:221–5.

Barton AB (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ Comp Biol* 42:513–525.

Boesten JJTI, Köpp H, Adriaanse PI, Brocka TCM, Forbes VE (2007) Conceptual model for improving the link between exposure and effects in the aquatic risk assessment of pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf* 66:291–308.

Bücker A, Carvalho MS, Conceição MB, Alves-Gomes JA (2012) Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene. *J Brazilian Soc Ecotoxicol* 7:65–73.

Bücker A, Carvalho W, Alves-Gomes JA (2006) Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amaz* 36:357–364.

Caliani I, Porcelloni S, Mori G et al (2009) Genotoxic effects of produced waters in mosquito fish (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicol* 18:75–80.

Carrasco KR, Tylbury KL, Myers MS (1990) Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci* 47:2123-2136.

Çavaş T, Ergene-Gözükara S (2005a) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol* 74:264–271.

Çavaş T, Ergene-Gözükara S (2005b) Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ Mol Mutagen* 46:64–70.

Chen B, Xuan X, Zhu L et al (2004) Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters, sediments and soils of Hangzhou City, China. *Water Res* 38:3558–3568.

Clauss TM, Dove AD, Arnold JE (2008) Hematologic disorders of fish. *Vet Clin Exot Anim* 11:445–462.

Corseuil HX, Dal M, Marins M (1997) Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave? *Rev Eng Sanit Amb* 2:50–54.

Davis AK, Maney DL, Maerz JC (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct Ecol* 22:760–772.

Deguchi Y, Toyoizumi T, Masuda S, Yasuhara A, Mohri S, Yamada M, Inoue Y, Kinae N (2007) Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutat Res* 627:178–85.

Desai SR, Verlecar XN, Ansari ZA, Jagtap TG, Sarkar A, Vashistha D, Dalal SG (2010) Evaluation of genotoxic responses of *Chaetoceros tenuissimus* and *Skeletonema costatum* to water accommodated fraction of petroleum hydrocarbons as biomarker of exposure. *Water Res* 44: 2235–2244.

DIN, Deutsches Institut für Normung (1991) German standard methods for the examination of water, wastewater and sludge, substance group analysis (group F), determination of benzene and some of its derivatives by gas chromatography (F9), (DIN 38407 F9).

dos Anjos NA, Schulze T, Brack W, Val AL, Schirmer K, Scholz S (2011). Identification and evaluation of cyp1a transcript expression in fish as molecular biomarker for petroleum contamination in tropical fresh water ecosystems. *Aquat Toxicol* 103:46–52.

Eigenmann CH (1921) The American Characidae. *Mem Mus Comp Zool* 43: 209–310.

Froehner S, Maceno M, Luz EC, Souza DB, Machado KS (2010) Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments and their potential toxic effects. *Environ Monit Assess* 168:205–213.

Froehner S, Maceno M, Machado KS (2011) Predicting bioaccumulation of PAHs in the trophic chain in the estuary region of Paranaguá, Brazil. *Environ Monit Assess* 174:135–145.

Garutti V, Britski HA (2000) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comun Mus Ciênc Tecnol PUCRS* 13:65–88.

Ghadially FN (1982) Ultrastructure pathology of the cell and matrix. Butterworths, London, UK.

Gravato C, Santos MA (2002) Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocyte genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotoxicol Environ Saf* 5:115–127.

Hasue FM, Passos MJACR, Santos TCA et al (2013) Assessment of genotoxicity and depuration of anthracene in the juvenile coastal fish *Trachinotus carolinus* using the comet assay. *Braz J Oceanogr* 61:215–222.

Iwama G, Nakanishi T (1996) The fish immune system: organism, pathogen and environment. Academic Press, California.

Leme DM, de Angelis DDF, Marin-Morales MA (2008) Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquat Toxicol* 88:214–219.

Leme DM, Marin-Morales MA (2008) Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water-a case study. *Mutat Res* 650:80–86.

Manoli E, Samara C, Konstantinou I, Albanis, T (2000) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bulk precipitation and surface waters of Northern Greece. *Chemosphere* 41:1845-1855.

Martinez CBR, Souza MM (2002) Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comp Biochem Physiol* 133:151–160.

Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U (1995) Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev Environ Contam Toxicol* 143:79–165.

Modesto KA, Martinez CBR (2010) Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81:781–7.

Nussey G, Van Vuren JHJ, Preez HH (1995) Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comp Biochem Physiol* 111:369–380.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development (1992) Guideline for the testing of chemicals. Fish, acute toxicity test. OCDE/OECD, Paris.

Oliveira Ribeiro CA, Filipak Neto F, Mela M et al (2006) Hematological findings in Neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environ Res* 101:74–80.

Oliveira-Martins CR, Grisolia CK (2009) Toxicity and genotoxicity of wastewater from gasoline stations. *Genet Mol Biol* 6:832-853.

Pacheco M, Santos M (2001) Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 49:64–75.

Pádua SB, Ishikawa MM, Satake F, Hisano H, Tavres-Dias M (2009) Blood cells, leucogram and thrombogram of juveniles dourado (*Salminus brasiliensis*) in experimental condition of culture. *Rev Bras Med Vet* 31:282–287.

Ramsdorf WA, Ferraro MVM, Oliveira-Ribeiro CA, Costa JRM, Cestari MM (2009) Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environ Monit Assess* 158:77–85.

Ramsdorf WA, Vicari T, de Almeida MIM, Artoni RF, Cestari MM (2012) Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environ Monit Assess* 184:5841–5849.

Ribeiro DL, Barcelos GRM, d'Arce LPG (2014) Genotoxic effects of water from São Francisco River, Brazil, in *Astyanax paranae*. *Bull Environ Contam Toxicol* 93:274–279.

Sancho E, Fernandez-Vega C, Sanchez M, Ferrando MD, Andreu-Moliner E (2000) Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as Response to Herbicide-contaminated water. *Ecotoxicol Environ Saf* 46:57-63.

Silva RRP, Pires OR, Grisolia CK (2010) Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. *Genet Mol Biol* 33:750–755.

SM, Standard methods for the examination of water and wastewater (2005a) EDTA titrimetric method (2340 C). 21th edn. APHA, AWWA, WEF, Washington, pp 37-39.

SM, Standard methods for the examination of water and wastewater (2005b) Polynuclear aromatic hydrocarbons (6440 C). 21th edn. APHA, AWWA, WEF, Washington, pp 6: 91.

Tavares-Dias M, Moraes FR (2004) Hematologia de peixes teleósteos. Tavares-Dias M, Ribeirão Preto.

Tavares-Dias M, Schalch SHC, Moraes FR (2003) Hematological characteristics of brazilian teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo state, Brazil. *B Inst Pesca* 29:109-115.

Trujillo-Jiménez P, Sedeño-Díaz JE, Camargo JA, López-López E (2011) Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). *Ecol Indic* 11:1636–1646.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (1996) Ecological effects test guidelines. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. EPA, Washington.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (1998) Guidelines for Ecological Risk Assessment. EPA, Washington.

Veiga ML, Egami MI, Ranzani-Paiva, MJT, Rodrigues EL (2000) Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev Chil Anat* 18:245-250.

Vicari T, Ferraro MVM, Ramsdorf WA, Mela M, Oliveira Ribeiro CA, Cestari MM (2012) Genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH₃Hg⁺) in *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 82:47–55.

Vieira CED, Almeida MDS, Galindo BA, Pereira L, Martinez CBR (2014) Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotrop Ichthyol* 12:153–164.

Witeska M (2005) Stress in fish – hematological and immunological effects of heavy metals. *Electron J Ichthyol* 1:35–41.

CAPÍTULO 4

Exposição e depuração da fração solúvel da gasolina sob a perspectiva de múltiplos biomarcadores

Resumo

Neste estudo foram avaliados os efeitos da exposição à concentração de 1,5% (v/v) da fração solúvel da gasolina (FSG) em *Astyanax altiparanae*. A concentração utilizada foi baseada no conceito de nível de segurança que estabelece que a concentração correspondente à 1% da concentração letal mediana (CL₅₀) é segura para os organismos aquáticos. Os peixes foram expostos por 96 horas à FSG e posteriormente passaram por períodos de depuração. Os efeitos subletais foram avaliados através de múltiplos biomarcadores em nível genético, celular, hematopoiético e somático. Além disso, foram quantificados os metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile dos peixes e a concentração de aromáticos na água. A maior parte das alterações biológicas foram observadas nos períodos de depuração em que as concentrações do contaminante na água estavam reduzidas e até mesmo ausentes. Esses resultados indicam que a concentração considerada segura gera efeitos tóxicos subletais e que podem se manifestar e persistir a longo prazo.

Palavras-chave: ecotoxicologia, genotoxicidade, citotoxicidade, índice somático.

Introdução

A gasolina é um contaminante dos ecossistemas aquáticos que causa grande impacto ecológico (Fedato *et al.*, 2010). A contaminação hídrica por hidrocarbonetos petrogênicos ocorre através de fontes pontuais como acidentes ambientais (Katsumiti *et al.*, 2008; Leme *et al.*, 2008) e por fontes difusas e contínuas através da descarga de efluentes (Avci *et al.*, 2005; Oliveira-Martins e Grisolia, 2009). Assim, a concentração desses compostos no ambiente é amplamente variável.

Um dos objetivos da pesquisa ecotoxicológica é prever os níveis de resíduos, como efluentes que são seguros em condições de exposição contínua (Tarzwell, 1962). Com este intuito foram desenvolvidas ferramentas para predição de efeitos que estabelecem níveis seguros de xenobióticos que presumidamente não apresentem efeitos subletais ou crônicos. Esse nível de segurança é calculado através da multiplicação da concentração letal mediana (CL_{50}) pelo fator de aplicação, que é uma unidade variável de acordo com o tipo de contaminante, podendo variar de 0,1 à 0,01 (Sprague, 1971).

O fator de segurança é utilizado atualmente pelas agências de regulamentação ambiental para determinação de critérios de qualidade da água e para o controle de lançamento de efluentes. No Canadá, é utilizado o fator de aplicação de 0,01 para compostos persistentes e 0,05 para não persistentes (CCME, 1991).

No Brasil, a Resolução CONAMA 430/2011, estabelece que os efluentes lançados diretamente no corpo receptor não devem causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos, sendo a concentração do efluente no corpo receptor menor ou igual ao valor da CL_{50} dividida por 10, para rios de classe 1 e 2, e o valor da CL_{50} dividido por 100 para rios de classe 3, ou seja, são utilizados fatores de aplicação de 0,1 à 0,01. A classificação dos corpos hídricos é baseada no seu uso, estabelecida pela Resolução CONAMA 357/2005.

Os critérios utilizados pela Legislação Ambiental para preservação dos ambientes aquáticos são baseados em testes de letalidade aguda com peixes, no entanto, basear-se apenas em dados de letalidade não é o suficiente, pois os organismos não devem apenas sobreviver e sim manter todas as suas funções. Os efeitos tóxicos dos contaminantes podem se manifestar em níveis subletais, tendo início através da interação com biomoléculas e podem gerar um efeito em cascata em

diferentes compartimentos biológicos (Newman e Unger, 2002). Esses efeitos podem ser mensurados através de biomarcadores em vários níveis de complexidade como individual, celular e molecular indicando alterações que podem afetar o desempenho e a saúde dos organismos e ser traduzidos em efeitos nas populações e comunidades (Kendall, 2001).

A elucidação da relação entre a exposição a contaminantes complexos e seus efeitos nos organismos aquáticos tem sido proposta para prover informações sobre seu significado biológico (Broeg *et al.*, 2005). Para uma avaliação mais completa dos efeitos de xenobióticos nos organismos são utilizados múltiplos biomarcadores (Hinton *et al.*, 1992) que possibilitam uma visão mais abrangente e confiável sobre o estado de saúde dos organismos, possibilitando avaliar o risco para uma população ou comunidade (Broeg e Lehtonen, 2006).

Neste estudo foram utilizados seis biomarcadores para avaliar os efeitos da FSG na espécie de peixe *A. altiparanae* (Characidae) após condições de exposição e depuração. O potencial genotóxico foi avaliado através do teste do micronúcleo písceo (MNT) e ensaio cometa, biomarcadores amplamente utilizados em testes com peixes (Al-Sabti, 1986a, Mitchelmore e Chipman, 1998; Winter *et al.*, 2004; Frenzilli *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 2010). A citotoxicidade foi avaliada através da análise da frequência de eritrócitos imaturos (Suzuki *et al.*, 1989) e pela análise da frequência de células viáveis, em necrose e apoptose através do ensaio de difusão do DNA (Gichner *et al.*, 2005).

Foram mensurados os índices somáticos que são importantes ferramentas para explicar os efeitos de poluentes em fatores que interferem no sucesso do organismo como crescimento, habilidade reprodutiva e longevidade (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005). E para avaliar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, foi utilizada a análise dos metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bile (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005).

Em eventos de contaminação do ambiente aquático por petróleo ou derivados, como a gasolina, ocorre solubilização de parte dos compostos (Winters e Parker, 1977). Essa fração solúvel da gasolina em água (FSG) é uma mistura complexa de hidrocarbonetos aromáticos lipofílicos, sendo este um importante fator para a indução de toxicidade, devido à capacidade de bioacumulação (Roubal *et al.*, 1977; Borgå, 2010; IARC, 2010).

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos tóxicos subletais da concentração considerada segura da fração solúvel da gasolina em *A. altiparanae* através de múltiplos biomarcadores e verificar se possíveis alterações induzidas pelo xenobiótico são passíveis de reversão após períodos de depuração.

Material e Métodos

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, certificado nº688.

As amostras de gasolina (CAS 8006-61-9) foram coletadas em postos de combustíveis aleatorizados do Estado do Paraná, Brasil e posteriormente homogeneizadas. A concentração de hidrocarbonetos aromáticos da gasolina foi determinada por infravermelho (ASTM, 2012).

A fração solúvel da gasolina (FSG) foi preparada misturando uma parte de gasolina em nove partes de água destilada (1:9) (Anderson et al. 1974), e em seguida foi submetida à rápida agitação durante 20 horas. Decorrido este período, as amostras ficaram em repouso por 30 minutos (Pacheco e Santos, 2001). A fase insolúvel foi descartada e a fração solúvel da gasolina (FSG 100%) foi diluída em água filtrada para obtenção da concentração de FSG 1,5% (v/v).

Os hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) da FSG foram mensurados por cromatografia gasosa/detector de ionização de chama (DIN, 1991) e os 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), considerados poluentes prioritários (US EPA, 1982) foram quantificados por cromatografia gasosa/espectrômetro de massas (SM, 2005).

A concentração da FSG 1,5% (v/v) foi utilizada por representar a concentração segura, calculada através da multiplicação do valor da concentração letal mediana (CL₅₀) pelo fator de aplicação 0,1 (Sprague, 1971). A CL_{50-96h} da FSG para *A. altiparanae* é de 15% (v/v) (ver Cap. 2), desta forma a concentração segura é 1,5% (v/v).

Os peixes foram obtidos de piscicultura local e aclimatados durante 60 dias em um tanque de 3000 litros, com água filtrada, com aeração constante, alimentação diária, com fotoperíodo natural e mantidos sob densidade de estocagem < 1g.L⁻¹ (ABNT, 2011). Posteriormente os peixes foram transferidos para os aquários de teste

e aclimatados por mais cinco dias com aeração constante. A alimentação foi interrompida 24 horas antes da contaminação.

Os peixes ($n = 80$) foram expostos à FSG 1,5% (v/v) por 96 horas, sem aeração, em sistema semi-estático com renovação de 25% da solução-teste a cada 24 horas (OECD 1992), decorrido este período, 20 peixes foram amostrados e os demais ($n = 60$) foram utilizados nos experimentos de depuração. Foi realizado um tratamento de depuração gradual (DG) no qual os peixes foram expostos à FSG 1,5% (v/v) por 7 dias com renovação de 25% do volume do aquário com o contaminante a cada 24 horas, seguido por oito dias de renovação com água filtrada, totalizando 15 dias de ensaio. Os peixes remanescentes foram transferidos para aquários com água limpa (filtrada) e amostrados em 15 dias (DEP 15) e 30 dias de depuração (DEP 30). A cada tratamento foram sacrificados 5 peixes do controle negativo (água filtrada). Para o ensaio cometa foi utilizado um tratamento adicional de controle positivo com injeção intraperitoneal de metil metanosulfonato (MMS 5,0 mg.Kg⁻¹) aplicado 24 horas antes da amostragem.

Para cada tratamento foram utilizados 20 peixes mantidos em densidade de estocagem menor que 1g.L⁻¹. A água utilizada no ensaio foi previamente filtrada por filtro de quartzo, filtros de 5 e 1 micrometro, carvão ativado e decolorada por aeração.

Os peixes foram anestesiados com benzocaína 0,15 g.L⁻¹ (Gontijo *et al.*, 2003), pesados, medidos (comprimento total e parcial) e sexados. Posteriormente os peixes foram sacrificados por secção medular, o sangue foi obtido por punção cardíaca com tubo capilar heparinizado e foram coletados os ovários, o líquido espermático, o fígado, rim, cérebro, brânquia e vesícula biliar. Os ovários e o fígado foram pesados.

O teste do micronúcleo písceo (MNT) com coloração fluorescente de laranja de acridina foi realizado com esfregaço do sangue periférico de acordo com Ueda *et al.* (1992). As anomalias nucleares (NA) foram analisadas em eritrócitos imaturos (policromáticos) e maduros (normocromáticos), sendo: micronúcleo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN) do tipo blebbed (BL), lobed (LB), vacuolated (VC), notched (NT) (Carrasco *et al.* 1990) e células binucleadas (BN) (Çavaş e Ergene-Gözükara, 2005). Foram analisados 1000 eritrócitos por peixe sob magnificação de 1000x em microscópio Leica de epifluorescência.

O ensaio cometa foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (2005) com modificações em relação a preparação das células. O sangue total (10 µL) foi diluído

em 1000 μ L soro bovino fetal (SBF) e 10 μ L dessa suspensão celular foi misturada em 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) (Ferraro *et al.*, 2004). Os outros tecidos foram acondicionados em microtubos com 500 μ L de SBF. Foi utilizado aproximadamente 1/5 do fígado, o 3° arco branquial, 1/2 ovário e o esperma de um testículo. A alíquota de 10 μ L do esperma diluído no SBF foi misturada em 120 μ L de LMP para a preparação das lâminas. Os demais tecidos foram desagregados (Potter-1.500 rpm) e foi utilizado 20 μ L de suspensão celular em 120 μ L de LMP.

A análise das lâminas do ensaio cometa com as células do sangue, fígado, rim, cérebro, brânquias e ovários, foi automatizada, utilizando microscópio de fluorescência Zeiss, com camera CCD monocromática, objetiva de 20X, programa Metafer 4 - CometScan - Metasystems. Foi realizada a varredura da região que compreende 20% ao redor do centro da lâmina e analisado o percentual de DNA na cauda de 100 nucleóides por lâmina. A análise das células germinativas de machos foi realizada visualmente, devido à alta densidade de células por campo da lâmina que impossibilitou a análise automatizada. Para a análise dessas células foi utilizado microscópio de epifluorescência Leica com aumento de 400x e realizada a classificação visual de 100 nucleóides por lâmina e determinação dos escores de danos (Collins *et al.*, 1995).

Não foram considerados na análise do ensaio cometa os nucleóides com a região da cabeça pequena ou inexistente e caudas largas e difusas, pois estão associados com morte celular (Olive *et al.*, 1993; Fairbairn *et al.*, 1996, Frenzilli *et al.*, 2009).

A análise da frequência de eritrócitos imaturos foi realizada nas mesmas lâminas do MNT, sendo contabilizado em 1000 eritrócitos a frequência (%) de células imaturas (Çavaş e Ergene-Gözükara, 2005) para avaliação de alterações no processo de eritropoiese.

O ensaio de difusão do DNA foi realizado com as células do sangue, das brânquias e do fígado, seguindo o mesmo procedimento do ensaio cometa, no entanto, as lâminas não foram submetidas à corrida de eletroforese (Singh, 2000). Foram analisados 100 nucleóides por lâmina e avaliada a frequência de células normais, apoptóticas e necróticas (Frenzilli *et al.*, 2004).

A quantificação dos metabólitos de HPAs na bile foi realizada de acordo com Osório *et al.* (2013) com modificações. O líquido biliar foi diluído (1:300) em etanol

48% e os HPAs foram detectados em espectrofotômetro (SUNRISE-TECAN) através da leitura de diferentes comprimentos de onda de excitação/emissão (288/330; 334/376; 364/406 e 380/422) correspondentes ao número de anéis de cada HPA (2; 4; 5 e 6 respectivamente). Para quantificação foram utilizados padrões de hidrocarbonetos de cada uma das classes (HPA mix, cod. 47930-U, SUPELCO) para estabelecimento da curva padrão de HPAs.

Os índices somáticos foram calculados de acordo com Oliveira Ribeiro *et al.* (2013), sendo, índice hepatossomático (IHS) = $[(P \text{ Fígado}/P \text{ peixe})] \times 100$; índice gonadossomático (IGS) = $[(P \text{ Gônada}/P \text{ peixe})] \times 100$ e o fator de condição de Fulton (K_f) = $100 \times P \text{ peixe} / C^3$, onde P é o peso do peixe em gramas e C é o comprimento total do peixe em centímetros. O IGS foi calculado para cada sexo separadamente de acordo com recomendações da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 2011).

Análise estatística

A distribuição dos dados foi verificada através do teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados do teste do micronúcleo písceo, ensaio cometa, frequência de eritrócitos imaturos e do ensaio de difusão do DNA não apresentaram distribuição normal e a análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's para comparação entre múltiplos tratamentos.

Os dados da quantificação de HPAs na bile tiveram distribuição normal desta foram foi utilizada a análise de variância (ANOVA 1 critério) seguido por teste-t para comparação entre duas amostras independentes. Os dados dos índices somáticos foram analisados por ANOVA 1 critério com pós teste de Tukey.

A comparação entre a concentração de hidrocarbonetos aromáticos presentes na água no período inicial do tratamento em relação aos demais períodos de amostragem foi realizada através do teste t-pareado.

Para todas as análises os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados e discussão

A gasolina que foi utilizada neste estudo para a preparação da fração solúvel da gasolina (FSG) continha $167,0 \text{ g.L}^{-1}$ de hidrocarbonetos aromáticos. Calculando a

proporção, a FSG 100% apresentou 47,35% do total de aromáticos da gasolina e a FSG 1,5% (v/v) continha 0,7% no início do experimento (tempo 0), com decréscimo significativo da concentração nos demais períodos de monitoramento (96 horas, 8 dias e 15 dias).

A concentração de hidrocarbonetos aromáticos presentes na FSG 100% e da FSG 1,5% (v/v) em diferentes períodos de amostragem está apresentada na Tabela 1. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, fenantreno, fluoranteno e pireno não foram detectados, sendo o limite de detecção $<0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) foram os compostos mais abundantes na FSG em comparação aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), exceto no tratamento de depuração gradual (DG).

No período inicial (0h) a concentração de hidrocarbonetos aromáticos correspondeu à 1,5% dos hidrocarbonetos aromáticos da FSG 100%, ou seja, a concentração nominal foi igual a concentração efetiva, mas após 96 horas houve um decréscimo significativo dos hidrocarbonetos, mesmo com a renovação da solução teste, indicando a alta volatilidade da amostra.

No oitavo dia, antes da renovação com água filtrada foi observada redução de 96,82% dos compostos em relação ao período inicial e no tratamento DG houve perda de 99,98% dos compostos, permanecendo apenas benzo(a)pireno ($0,26 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Akaishi *et al.* (2004) demonstraram que a perda de hidrocarbonetos de origem petrogênica diluídos em água é rápida, ocorrendo principalmente nas primeiras 4 horas após a diluição e em 24 horas podem ser perdidos cerca de 50% dos compostos.

A concentração dos hidrocarbonetos aromáticos na água é dependente de suas características físico-químicas, sendo que compostos com menor número e angularidade de anéis benzênicos, menor peso molecular (PM) e menor coeficiente de partição octanol/água (Log Kow) são mais solúveis e voláteis (Joa *et al.*, 2009). Isto explica a maior concentração do HPA naftaleno (2 anéis benzênicos, PM = 128) na fração solúvel da gasolina, assim como sua rápida volatilização, em comparação ao HPA benzo(a)pireno (5 anéis, PM = 252) que foi menor no período inicial, mas foi o único composto que permaneceu na depuração gradual (DG).

A alta concentração de BTEX na fração solúvel se deve ao fato de que estes são os hidrocarbonetos aromáticos mais abundantes na gasolina (Adami *et al.*, 2006) e relativamente mais solúveis que os HPAs (Desai *et al.*, 2010). Entre os BTEX, o tolueno e o benzeno foram os principais compostos na FSG 100%. O benzeno é um contaminante de ampla toxicidade por promover disfunção do sistema imune (ATSDR, 2007), endócrino, reprodutivo, nervoso, cardiovascular e respiratório (Bahadar *et al.*, 2014) e é carcinogênico para humanos (IARC, 2005). O tolueno é neuro e hepatotóxico e, assim como outros solventes orgânicos, causa estresse oxidativo (Huang *et al.*, 1992; Bae e Yoon, 2001; Tas *et al.*, 2011).

A análise dos efeitos biológicos dos hidrocarbonetos isolados é importante, no entanto, não pode ser comparada diretamente com os efeitos de exposição às misturas complexas como encontrado na FSG, visto que os compostos podem interagir, aumentando ou diminuindo seu potencial tóxico, como ocorre entre os BTEX (Singh *et al.*, 2010) que em mistura apresentam efeito sinérgico, com o aumento no seu potencial mutagênico (Mazzeo *et al.*, 2011).

A exposição dos peixes à FSG 1,5 (v/v) por 96 horas não alterou a frequência de MN, já no tratamento de depuração gradual (DG) houve indução de MN mesmo com redução da concentração de hidrocarbonetos aromáticos, seguido por normalização no período de depuração total de 15 e 30 dias (DEP 15 e DEP 30). O número de alterações morfológicas nucleares não foi alterado em nenhum tratamento (Tabela 2).

O aumento da frequência de MN apenas no tratamento DG que apresentou menor concentração de aromáticos em comparação à exposição por 96 horas, indica que os efeitos mutagênicos da FSG não representam uma simples relação dose-resposta e estão em desacordo com o estabelecido de que o pico de eritrócitos micronucleados ocorra no 2º e 3º dia de exposição ao contaminante (Udroiu, 2006).

Tabela 1. Concentração de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) da fração solúvel da gasolina (FSG) e percentual de perda dos compostos.

Nº anéis aromáticos	FSG (v/v)	100%	1,5%	1,5%	1,5%	DG
	Período	0h	0h	96h	8d	15d
1	Benzeno	31.227,00	428,70	47,00	24,70	<5,00
1	Etilbenzeno	2.349,50	39,70	<5,00	<5,00	<5,00
1	Tolueno	36.436,50	515,30	28,80	10,20	<5,00
1	m,p-Xileno	4.279,40	75,10	8,90	<5,00	<5,00
1	o-Xileno	4.629,00	82,30	11,60	<5,00	<5,00
	Total BTEX($\mu\text{g.L}^{-1}$)	7.8921,40	1.141,10	96,30	34,90	0,00
3	Acenafetileno	0,13	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
3	Acenafteno	0,60	0,07	<0,01	<0,01	<0,01
5	Benzo(a)pireno	0,30	0,30	0,29	0,26	0,26
3	Fluoreno	0,50	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
2	Naftaleno	146,21	10,43	1,51	1,49	<0,01
	Total HPAs ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	147,74	10,79	1,80	1,75	0,26
	Σ (BTEX e HPAs)	79.069,14	1.151,60	98,10	36,39	0,26
	Perda (%)	-	0,00	91,48'	96,82*	99,98*

*diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação ao tratamento inicial de FSG 1,5% no período 0h.

Vários trabalhos descrevem a indução de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em peixes expostos a resíduos de petróleo e derivados ou em ambientes com a presença de HPAs de diversas fontes (Pacheco *et al.*, 2005; Vanzella *et al.*, 2007; Caliani *et al.*, 2009; Katsumiti *et al.*, 2008; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2013), assim como expostos a hidrocarbonetos aromáticos isolados (Al-Sabti, 1986b; Teles *et al.*, 2003). No entanto, a indução de MN em peixes expostos a hidrocarbonetos aromáticos apresenta bastante variação de resposta e pode ser dependente de fatores como a dose (Deguchi *et al.*, 2007), tempo de exposição (Bücker *et al.*, 2006), tecido ou espécie avaliada (Barsiene *et al.*, 2006).

Tabela 2. Frequência (%) de anomalias nucleares em *Astyanax altiparanae* após exposição e depuração à fração solúvel da gasolina (FSG).

Tratamentos	BL	VC	BN	NT	Subtotal	MN	Total
CN	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,1)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,1 (0,1 – 0,4)	0,1 (0,1 – 0,4)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,1 (0,1 – 0,4)
FSG 96h	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,1 (0,0 – 0,2)	0,1 (0,0 – 0,3)	0,0 (0,0 – 0,1)	0,2 (0,0 – 0,4)
DG	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,2 (0,1 – 0,5)	0,2 (0,1 – 0,5)	0,2 (0,0 – 0,3)**	0,4 (0,1 – 0,8)
DEP 15	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,5)	0,0 (0,0 – 0,1)	0,2 (0,1 – 0,6)	0,2 (0,2 – 0,8)	0,0 (0,0 – 0,1)	0,2 (0,2 – 0,9)
DEP 30	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,1)	0,0 (0,0 – 0,1)	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,1)

CN: controle negativo (água filtrada); FSG 96 h: exposição à FSG 1,5% (v/v) por 96 horas; DG: depuração gradual; DEP 15: depuração total por 15 dias; DEP 30: depuração total por 30 dias. BL: blebbed; VC: vacuolated; BN: binúcleo; NT: notched; MN: micronúcleo. Resultados apresentados como Mediana (1° Quartil – 3° Quartil). Asteriscos (**) indicam diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,01$).

Os resultados do ensaio cometa estão apresentados na Figura 1. A exposição dos peixes à FSG 1,5% (v/v) por 96 horas causou aumento de danos no DNA das células do sangue e esses danos não foram reparados nos períodos de depuração.

Nas células do fígado foi observado aumento significativo de danos no DNA no período de depuração de 15 dias (DEP 15). Nas células da brânquia e dos ovários não foi observado efeito genotóxico. Nos espermatozóides houve aumento gradual de danos, mas efeitos significativos de genotoxicidade foram observados apenas após 30 dias de depuração. O controle positivo (CP) com MMS foi genotóxico para as células do sangue e espermatozóides.

Esses resultados indicam que o xenobiótico atua em tecidos alvo, como o sangue, fígado e nas células reprodutivas de machos. Nas células do sangue os efeitos genotóxicos foram evidenciados já no período agudo (96 h), se mantiveram no período subcrônico (DG) e não foram reparados após longos períodos de depuração total (DEP 15 e DEP 30). Já os danos no DNA das células do fígado e nos espermatozoides foram detectados somente nos períodos de depuração, indicando um mecanismo diferente de atuação do xenobiótico. A diferença de sensibilidade entre tecidos pode estar associada a biodisponibilidade, capacidade de detoxificação ou de reparo do DNA do tecido alvo.

A genotoxicidade pode ser reduzida quando o organismo é exposto a baixas concentrações de hidrocarbonetos e ocorre em função do tempo de depuração, já em altas concentrações do xenobiótico a indução de danos severos compromete o processo de reparo do DNA (Hasue *et al.*, 2013).

Danos no DNA, especialmente quebras de fita dupla, indicam instabilidade genômica e, se não reparados, aumentam as taxas de mutações (Gent *et al.*, 2001) e consequentemente o risco de câncer em células somáticas. E podem prejudicar a reprodução e a prole quando atingem as células germinativas (Baumgartner *et al.*, 2009).

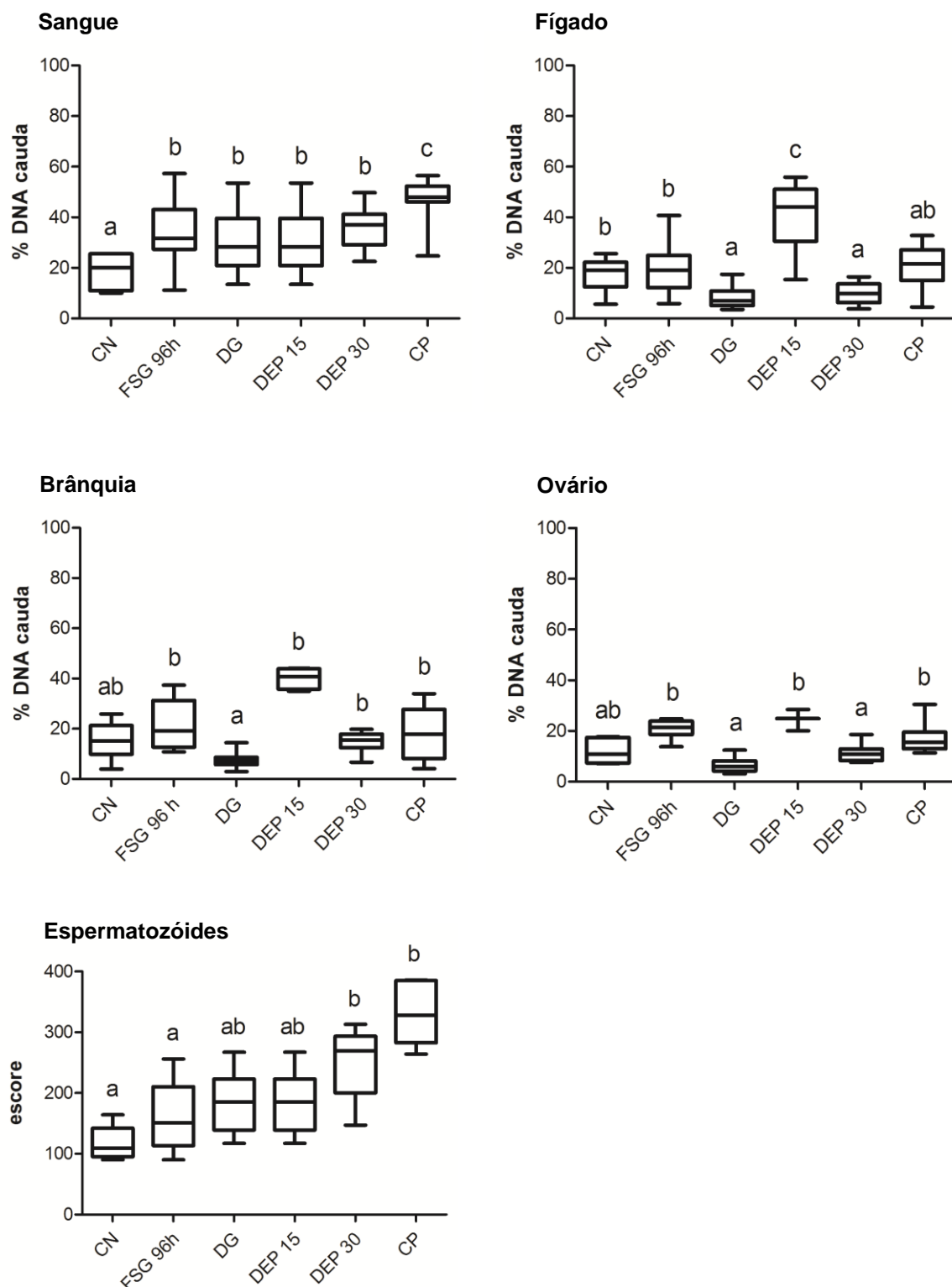


Figura 1. Danos no DNA de *A. altiparanae* avaliados através do ensaio cometa em células do sangue; fígado; brânquia; ovário e espermatozoides. Tratamentos: controle negativo (CN); exposição à FSG 1,5% (v/v) por 96 horas (FSG 96h); depuração gradual (DG); depuração total de 15 dias (DEP 15) e depuração total de 30 dias (DEP 30).

A frequência de eritrócitos imaturos (EI) não foi alterada com a exposição dos peixes à FSG 1,5% (v/v) por 96 horas, já no tratamento de depuração gradual (DG) houve aumento de EI em comparação ao controle negativo. Nos períodos de depuração total (DEP 15 e DEP 30) houve redução gradual e normalização da frequência de EI (Figura 2).

A determinação da frequência de EI fornece informações importantes sobre a dinâmica hematológica e o aumento de EI pode ser evidenciado quando há aumento da remoção de eritrócitos maduros inviáveis pelo baço sem que haja alteração no processo de eritropoiese (Pacheco e Santos, 2002). No entanto, nossos resultados indicam que não houve diminuição de células viáveis através da análise de citotoxicidade com o ensaio de difusão do DNA (Tabela 3) indicando que o aumento na frequência de eritrócitos imaturos no sangue periférico ocorreu em função do aumento da taxa de eritropoiese, possivelmente como um mecanismo para reestabelecer as condições celulares normais devido aos efeitos da exposição à FSG. Em peixes, o aumento de EI na circulação pode ocorrer em resposta à estressores ambientais, como agentes tóxicos, hipoxia, alterações da temperatura e também como uma condição regenerativa pós anemia (Clauss *et al.*, 2008).

Apesar da renovação celular no tratamento DG, não houve redução de genotoxicidade dos eritrócitos, como observado através do ensaio cometa e teste do micronúcleo písceo.

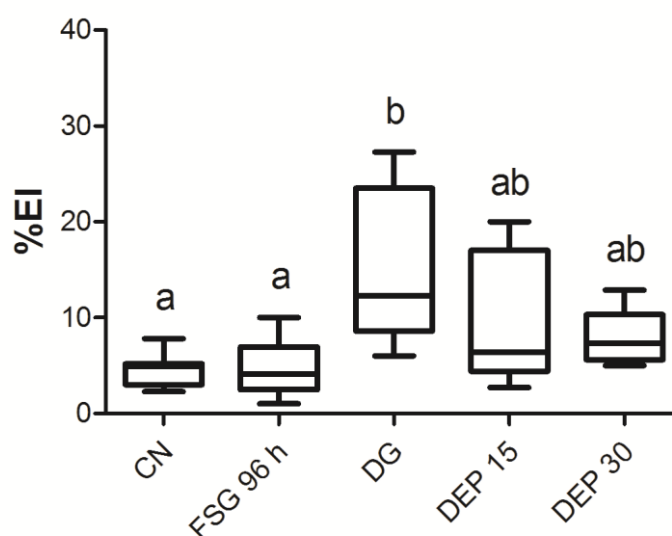


Figura 2. Frequência de eritrócitos imaturos de *A. altiparanae* após exposição à FSG 1,5% (v/v) por 96 horas (FSG 96h) e após períodos de depuração, sendo depuração gradual (DG) e total de 15 (DEP 15) e 30 dias (DEP 30).

Não houve efeito citotóxico nas células do sangue, fígado e brânquias (Tabela 3). Em todos os tratamentos, a porcentagem de células viáveis atendeu aos requisitos necessários para a validação do ensaio cometa *in vivo*, em que é recomendado que a viabilidade das células do tecido alvo não seja menor que 70 a 80% em comparação aos animais do controle negativo, ou seja, os tratamentos que induzirem danos citotóxicos severos com diminuição da viabilidade celular maior que 20-30% não devem ser considerados para a avaliação de genotoxicidade (Tice *et al.*, 2000).

Os resultados da quantificação de metabólitos de hidrocarbonetos aromáticos na bile estão apresentados na Figura 3. Foi observado aumento significativo apenas de HPAs com dois anéis aromáticos, o que pode estar relacionado a predominância de naftaleno na água (2 anéis). Esse aumento de metabólitos foi observado exclusivamente em 96 horas de exposição à FSG 1,5% (v/v) e, tendo em vista que o tempo de meia vida do naftaleno na bile é de 1,8 dias \pm 0,2 (Valdez Domingos *et al.*, 2011) indica que esses metabólitos estão associados a eliminação do naftaleno que entrou no organismo desde o início da exposição e não somente reflete a concentração do naftaleno na água no tempo de 96 horas.

Nos períodos de depuração houve redução da concentração desses metabólitos na bile, coincidindo com a ausência de HPAs com dois anéis aromáticos na água, visto que a concentração de metabólitos na bile decresce rapidamente após cessar a exposição (Meador *et al.*, 1995).

A concentração de metabólitos com 4, 5 e 6 anéis aromáticos não foi alterada significativamente, embora haja uma tendência de aumento no tratamento de 96 horas de exposição. Os HPAs com 4 e 6 anéis aromáticos não foram detectados na FSG, já o HPA benzo(a)pireno (5 anéis) foi o segundo composto mais concentrado na água até o 8º dia de exposição e o único HPA presente no tratamento DG. No entanto, não foram acumulados metabólitos com 5 anéis na bile. Em peixes o benzo(a)pireno apresenta baixa absorção pelo intestino ficando acumulado nos tecidos (Neff, 2002), principalmente em estoques lipídicos, não ficando disponível para a metabolização e consequentemente para a excreção. Além disso, quando disponível, esse composto apresenta baixa taxa de biotransformação por ter pouca afinidade pelas enzimas monooxigenases (Meador *et al.*, 1995).

Tabela 3. Avaliação de citotoxicidade através do ensaio de difusão do DNA mensurados em diferentes tecidos, após períodos de exposição e depuração à FSG.

Células	Sangue				Fígado				Brânquia			
(%)	normal	apoptose	necrose	viabilidade	Normal	apoptose	necrose	Viabilidade	normal	apoptose	necrose	viabilidade
CN	97,9 ± 2,6	2,1 ± 2,6	0,0 ± 0,0	-	95,8 ± 4,4	4,0 ± 4,2	0,2 ± 0,4	-	88,3 ± 9,4	13,0 ± 12,9	0,4 ± 0,7	-
FSG 96 h	91,4 ± 10,0	8,4 ± 9,6	0,2 ± 0,6	- 6,64	93,0 ± 5,0	6,0 ± 5,0	3,0 ± 0,6	- 2,92	85,6 ± 11,7	13,6 ± 11,3	5,1 ± 4,0	- 3,06
DG	94,6 ± 13,5	5,2 ± 8,0	0,0 ± 0,0	- 3,37	94,0 ± 4,8	5,2 ± 3,9	0,8 ± 2,0	- 1,88	90,7 ± 8,2	8,6 ± 7,6	0,6 ± 1,3	+ 2,72
DEP 15	95,0 ± 0,0	5,0 ± 3,0	0,0 ± 0,0	- 2,96	93,0 ± 6,0	7,0 ± 5,0	0,0 ± 0,0	- 2,92	84,0 ± 9,0	15,0 ± 7,0	1,0 ± 0,0	- 4,87
DEP 30	95,4 ± 6,6	4,6 ± 6,6	0,3 ± 0,5	- 2,55	95,0 ± 3,0	4,1 ± 3,1	0,9 ± 1,4	- 0,84	74,6 ± 16,0	24,2 ± 16,1	0,8 ± 1,1	- 15,52
MMS	93,7 ± 10,3	6,0 ± 9,4	0,2 ± 0,7	- 4,29	95,2 ± 4,5	4,0 ± 1,0	0,8 ± 2,4	- 0,63	73,6 ± 24,3	25,5 ± 23,3	0,8 ± 1,3	- 16,65

Frequência de células normais, em apoptose e necrose. Redução (%) da viabilidade celular em comparação ao controle negativo. CN: controle negativo (água filtrada); FSG 96 h: exposição à FSG 1,5% (v/v) por 96 horas; DG: depuração gradual; DEP 15: depuração total por 15 dias; DEP 30: depuração total por 30 dias; MMS: i.ip. de metil metanosulfonato (5,0 mg.Kg⁻¹). Valores apresentados como porcentagem média e desvio padrão (M ± DP).

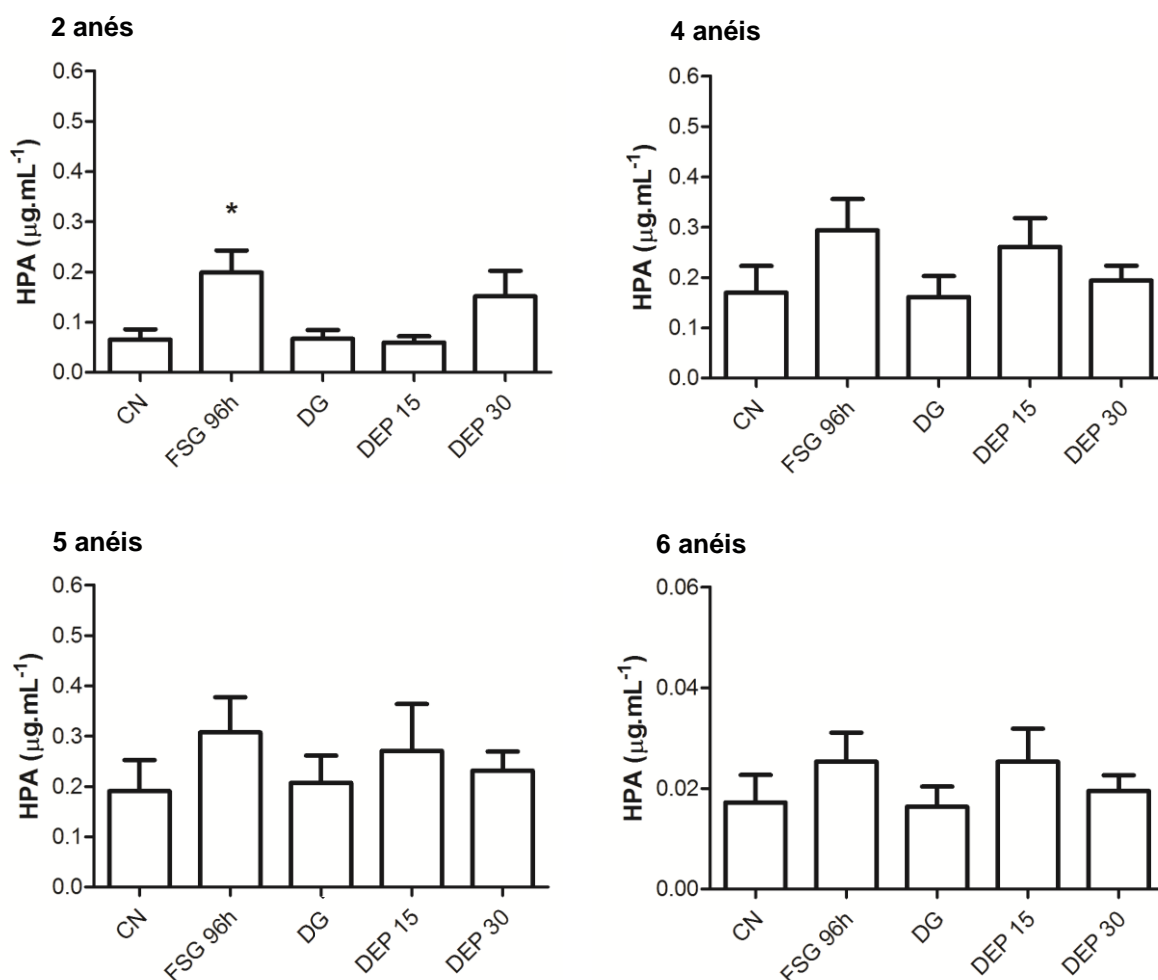


Figura 3. Concentração de metabólitos de HPAs com 2, 4, 5 e 6 anéis benzênicos na bile de *A. altiparanae*, após 96 horas de exposição à FSG 1,5% (v/v) (FSG 96h) e após períodos de depuração, sendo depuração gradual (DG) e total de 15 (DEP 15) e 30 dias (DEP 30).

Os resultados dos índices somáticos de *A. altiparanae* estão apresentados na Figura 4. O fator de condição de Fulton (K_f), que indica o grau de desenvolvimento dos peixes, foi reduzido significativamente nos tratamentos DG e DEP 15, sendo reestabelecido após 30 dias de depuração (DEP 30). A avaliação da condição, baseada nos dados de comprimento e peso são prática padrão em estudos de ecologia de peixes e assumem que peixes mais pesados e com o mesmo comprimento estão em melhor condição, sendo um bom indicador de bem estar ou “fitness” da população (Bolger e Connolly, 1989).

O índice hepatossômico (IHS) foi reduzido no tratamento DEP 15 e normalizado no tratamento DEP 30. O IHS representa o percentual de massa do fígado em relação ao peso corporal, sendo utilizado para quantificar o estoque de energia (glicogênio) (Cyrino *et al.*, 2000), que é uma das muitas formas de armazenamento da energia consumida pelo peixe, sendo encontrado, em grandes

quantidades no fígado e músculo dos peixes (Navarro *et al.*, 2009). Assim, esse índice está relacionado com a mobilização das reservas energéticas necessária para o processo de vitelogênese, reprodução ou preparação para os períodos de escassez de recursos (Querol *et al.*, 2002).

Nossos resultados indicam que o IHS não é somente alterado pelas condições ambientais e fisiológicas normais, mas também responde à exposição a xenobióticos. A diminuição significativa no IHS observada no período DEP 15 pode ser uma resposta de mobilização das reservas enérgicas na tentativa do organismo de reestabelecer suas condições normais frente ao estresse gerado pela contaminação com a FSG. Essa hipótese, é corroborada pelo trabalho de Simonato *et al.* (2013), em que foi demonstrado que peixes expostos à FSG exibem hiperglicemia e redução na concentração de proteínas plasmáticas, indicando a disponibilização de reservas de energia para uso imediato, sendo uma típica resposta de estresse secundária.

O índice gonadossomático não foi alterado em nenhum tratamento, baseando-se nessa métrica, o estado reprodutivo não foi afetado pelo xenobiótico. Os valores dos IGS dos peixes do controle foram de 1-4% para machos e 13 – 19% para as fêmeas, bem maiores que os valores descritos para a espécie *Pimephales promelas* (Cyprinideo) que é de 1-2 para machos e 8-13% para fêmeas (US EPA, 2011), indicando a variação dos índices entre espécies. Além disso, os peixes utilizados neste estudo estavam em período reprodutivo, com as gônadas maduras o que contribui para o aumento dos valores dos índices.

Em geral, os resultados do teste do MN, ensaio cometa, assim como a frequência EI e os resultados dos índices somáticos não mostraram alterações no organismo em 96 horas de exposição à FSG, mas indicaram efeitos tóxicos nos períodos de depuração, alertando para o fato de que ensaios agudos podem gerar resultados falso negativos para avaliação ecotoxicológica de hidrocarbonetos de origem petrogênica por apresentarem efeitos tóxicos a longo prazo.

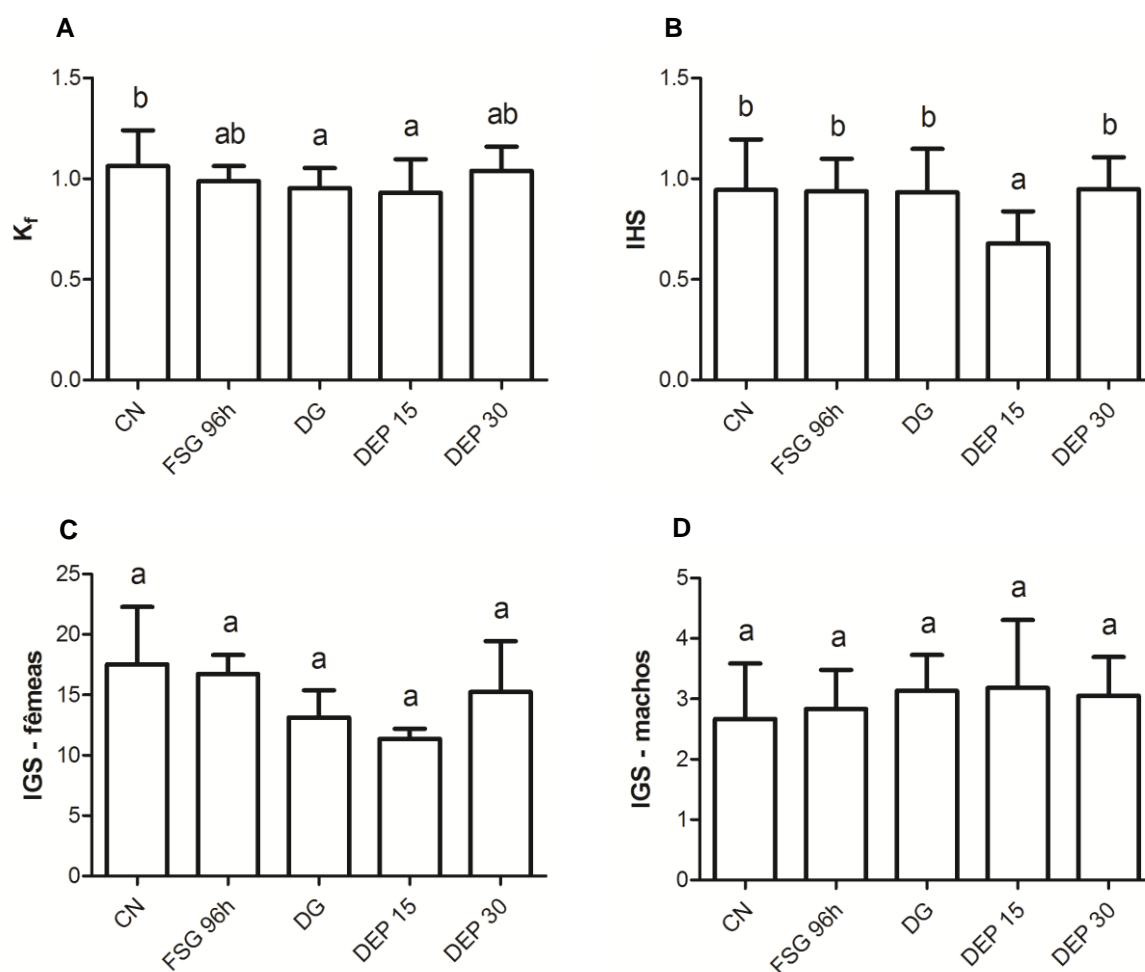


Figura 4. Índices somáticos de *A. altiparanae* após 96 horas de exposição à FSG 1,5% (v/v) (FSG 96h) e após períodos de depuração, sendo depuração gradual (DG) e total de 15 (DEP 15) e 30 dias (DEP 30). Em a) fator de condição de Fulton (K_t); b) índice hepatossomático (IHS); c) índice gonadosomático de fêmeas (IGS) e d) índice gonadosomático de machos (IGS).

Considerações finais

A fração solúvel da gasolina (FSG), contendo baixas concentrações de aromáticos em comparação a gasolina pura e seus compostos, mesmo apresentando baixo tempo de permanência na água foi capaz de induzir efeitos genotóxicos em diversos tecidos, causar alterações da eritropoiese e nos fatores de condição de *A. altiparanae*. Alguns parâmetros biológicos foram restaurados após prolongados períodos de depuração em água limpa, no entanto, os efeitos genotóxicos nas células do sangue e em espermatozoides foram mantidos, indicando que a toxicidade não cessa quando termina a exposição.

A contínua entrada de contaminantes de origem petrogênica no ambiente aquático e consequente distribuição desses em diferentes compartimentos, torna o

processo de depuração natural inviável, mantendo os organismos expostos a estes compostos tóxicos com risco de efeitos pronunciados a longo prazo.

Diante dos efeitos tóxicos subletais induzidos pela concentração estimada como segura, fica evidente que não existem níveis de segurança adequados para proteção dos organismos aquático frente à contaminação pela FSG.

Referências

Adami G, Larese F, Venier M, Barbieri P, Lo Coco F, Reisenhofer E (2006) Penetration of benzene, toluene and xylenes contained in gasolines through human abdominal skin in vitro. *Toxicol in Vitro* 20:1321–30.

Akaishi FM, Assis HCS de, Jakobi SCG, Eiras-Stofella DR, St-Jean SD, Courtenay SC, Lima EF, Wagener ALR, Scofield AL, Oliveira Ribeiro CA (2004) morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:244–253.

Al-sabti K (1986a) Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp Biochem Physiol C* 85:5-9.

Al-Sabti K (1986b) Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. *Cytobios* 47:147-154.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2012) Standard test method for determination of benzene in spark-ignition engine fuels using mid infrared spectroscopy, (D 6277). *Annual Book of ASTM Standards*, West Conshohocken, PA, USA, vol. 05.03, 10p.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007) Toxicological Profile for Benzene. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 7p.

Avci A, Kaçmaz M, Durak I (2005) Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol Environ Saf* 60:101–105.

Bae SW, Yoon IS (2001) The beneficial effects of melatonin for toluene hepatotoxicity in rats. *Journal of Biomedical Laboratory Sciences* 7:99–102.

Bahadar H, Mostafalou S, Abdollahi M (2014) Current understandings and perspectives on non-cancer health effects of benzene: a global concern. *Toxicol Appl Pharmacol* 276:83–94.

Barbosa JS, Cabral TM, Ferreira DN, Agnez-Lima LF, Medeiros SRB (2010) Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:320-325.

Barsiene J, Dedonyte V, Rybakovas A, Andreikenaite L, Andersen OK (2006) Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquat Toxicol* 78 Suppl 1:S99–104.

Baumgartner A, Cemeli E, Anderson D (2009) The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol Toxicol* 25:81–98.

Bolger T, Connolly PL (1989) The selection of suitable indices for measurement and analysis of fish condition. *J Fish Biol* 34:171–182.

Borgå, K (2010) Bioaccumulation. In: Jorgensen SE (Ed.) *Ecotoxicology*. Amsterdam, Academic Press, pp.70–72.

Broeg K, Lehtonen KK (2006) Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Mar Pollut Bull* 53:508–22.

Broeg K, Westernhagen HV, Zander S, Korting W, Koehler A (2005) The Bioeffect assessment index - a concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Mar Pollut Bull* 50:495–503.

Bücker A, Carvalho W, Alves-Gomes JA (2006) Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amaz* 36:357–364.

Caliani I, Porcelloni S, Mori G, Frenzilli G, Ferraro M, Marsili L, Casini S, Fossi MC (2009) Genotoxic effects of produced waters in mosquito fish (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicology* 18:75–80.

Carrasco KR, Tylbury KL, Myers MS (1990) Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci* 47:2123–2136.

Çavaş T, Ergene-Gözükara S (2005) Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ Mol Mutagen* 46:64–70.

CCME, Canadian Council of Resource and Environment Ministers (1991) Canadian water quality guidelines: Ottawa, Ontario, Environment Canada, Inland Waters Directorate, Water Quality Branch.

Clauss TM, Dove ADM, Arnold JE (2008) Hematologic disorders of fish. *Vet Clin Exot Anim* 11:445–462.

Collins AR, Ma AG, Duthie SJ (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells. *Mutat Res* 336:69–77.

CONAMA, Conselho Nacional de Meio Ambiente (2005). Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Classificação dos Corpos de Água. 23p.

CONAMA, Conselho Nacional de Meio Ambiente (2011). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 do CONAMA. 9p.

Cyrino JEP, Pórtz L, Martino RCI. Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass” *Micropterus Salmoides*. Sci Agric, v.57, p.609-616, 2000.

Deguchi Y, Toyoizumi T, Masuda S, Yasuhara A, Mohri S, Yamada M, Inoue Y, Kinae N (2007) Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. Mutat Res 627:178–85.

Desai SR, Verlecar XN, Ansari ZA, Jagtap TG, Sarkar A, Vashistha D, Dalal SG (2010) Evaluation of genotoxic responses of *Chaetoceros tenuissimus* and *Skeletonema costatum* to water accommodated fraction of petroleum hydrocarbons as biomarker of exposure. Water Res 44: 2235-2244.

DIN, Deutsches Institut für Normung (1991) German standard methods for the examination of water, wastewater and sludge, substance group analysis (group F), determination of benzene and some of its derivatives by gas chromatography (F9), (DIN 38407 F9).

Fairbairn DW, Walburger, DK, Fairbairn JJ, O'Neill KL (1996) Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. Scanning, 18:407-416.

Fedato RP, Simonato JD, Martinez CBR, Sofia SH (2010) Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. Mutat Res 700:80–5.

Ferraro M, Fenocchio A, Mario Sérgio Mantovani C de OR and MMC (2004) Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration. Genet Mol Biol 27:103–107.

Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutat Res 681:80-92.

Frenzilli G, Scarcelli V, Del Barga I, Nigro M, Förlin L, Bolognesi C, Sturve J (2004) DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. Mutat Res 552:187–195.

Gent DC Van, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. Nat Rev Genet 2:196–206.

Gichner T, Mukherjee A, Wagner ED, Plewa MJ (2005) Evaluation of the nuclear DNA Diffusion Assay to detect apoptosis and necrosis. Mutat Res 586:38–46.

Gontijo ÁMMC, Barreto RE, Speit G, Reyes VAV, Volpato GL, Salvadori DMF (2003) Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutag* 534:165-172.

Hasue FM, Passos MJACR, Santos TCA, Rocha AJS, Vignardi CP, Sartorio PV, Gomes V, Van Ngan P (2013) Assessment of genotoxicity and depuration of anthracene in the juvenile coastal fish *Trachinotus carolinus* using the comet assay. *Braz J Oceanogr* 61:215–222.

Hinton DE, Baumann PC, Gardner GR, Hawkins WE, Hendricks JD, Murchelan RA, Okihiro MS (1992) Histopathologic biomarkers. In: Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle Jr PM, Bergman HL (Eds) Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 155-208.

Huang J, Asaeda N, Takeuchi Y, Shibata E, Hisanaga N, Ono Y, Kanefusa K (1992) Dose dependent effects of chronic exposure to toluene on neuronal and glial cell marker proteins in the central nervous system of rats. *Br J Ind Med* 49:282–6.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2005) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Benzene, World Health Organization (WHO), LYON, FRANCE, v.100F, pp.249-294.

IARC, International agency for research on cancer (2010) Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, vol. 92, IARAC, Lyon, France, 868p.

Joa K, Panova E, Irha N, Teinemaa E, Lintelmann J, Kirso U (2009) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oil shale processing wastes: current practice and new trends. *Oil Shale* 26:59-72.

Katsumiti A, Valdez Domingos FX, Azevedo M, da Silva MD, Damian RC, Almeida MIM, Silva de Assis HC, Cestari MM, Randi MAF, Oliveira Ribeiro CA, Freire CA (2008) An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña oil spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environ Monit Assess* 152:209–222.

Kendall RJ, Anderson TA, Baker RJ, Bens CM, Carr JA, Chiodo LA, Cobb III GP, Dickerson RL, Doxon KR, Frame LT, Hooper MJ, Martin CF, Mcmurry ST, Patino R, Smith EE, Theodorakis CW (2001) Ecotoxicology. In: Klaassen CD (Ed), Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 6th ed., McGraw-Hill, New York, pp. 1013-1045.

Leme DM, de Angelis DDF, Marin-Morales MA (2008) Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquat Toxicol* 88:214–9.

Mazzeo DEC, Fernandes TCC, Marin-Morales MA (2011) Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. *Chemosphere* 85:13–18.

McDaid J, Yamashita K, Chora A, Ollinger R, Strom TB, Li XC, Bach FH, Soares MP (2005) Heme oxygenase-1 modulates the allo-immune response by promoting activation-induced cell death of T cells. *FASEB J* 19:458–60.

Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U (1995) Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev Environ Contam Toxicol* 143:79–165.

Michael C. Newman MC, Unger MA (2002) *Fundamentals of Ecotoxicology*, Second Edition, CRC Press, Boca Raton, 480 p.

Mitchelmore CL, Chipman JK (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res* 399:135-147.

Navarro RD, Pinto O, Motta W, Silva F (2009) A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim* 33:20–25.

Neff JM (2002) *Bioaccumulation in marine organisms: effect of contaminants from oil well produced water*. Elsevier, Oxford, 468 p.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development (1992) *Guideline for the testing of chemicals. Fish, acute toxicity test*. OCDE/OECD, Paris.

Olive PL, Frazer G, Banath JP (1993) Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the Comet assay. *Radiat Res* 136: 130–136.

Oliveira Ribeiro CA, Katsumiti A, França P, Maschio J, Zandoná E, Cestari MM, Vicari T, Roche H, Silva de Assis HC, Filipak Neto F (2013) Biomarkers responses in fish (*Atherinella brasiliensis*) of paranaguá bay, southern Brazil, for assessment of pollutant effects. *Braz J Oceanogr* 61:1–11.

Oliveira Ribeiro CA, Voltaire Y, Sanchez- Chardi A, Roche H (2005) Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquat Toxicol* 74:53- 69.

Osório FHT, Silva LFO, Piancini LDS, Azevedo ACB, Liebel S, Yamamoto FY, Philippi VP, Oliveira MLS, Ortolani-Machado CF, Neto FF, Cestari MM, Silva de Assis HC, Oliveira Ribeiro (2013) Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environ Sci Pollut Res* 21:9145-9160.

Pacheco M, Santos M (2001) Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 49:64–75.

Pacheco M, Santos MA, Teles M, Oliveira M, Rebelo JE, Pombo L (2005) Biotransformation and genotoxic biomarkers in mullet species (*Liza* sp.) from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Environ Monit Assess* 107:133–53.

Pacheco S, Santos M.A (2002) Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* 53:331-347.

Querol MVM, Querol E, Gomes NNA (2002) Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio Uruguai médio, sul do Brasil. *Iheringia Série Zool* 92:79–84.

Roubal WT, Collier TK, Malrns DC (1977) Accumulation and metabolism of carbon-14 labeled benzene, naphthalene, and anthracene by young coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Arch Environ Contam Toxicol* 5:513–529.

Simonato JD, Fernandes MN, Martinez CBR (2013) Physiological effects of gasoline on the freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotrop Ichthyol* 11:683–691.

Singh MP, Ram KR, Mishra M, Shrivastava M, Saxena DK, Kar Chowdhuri D (2010) Effects of co-exposure of benzene, toluene and xylene to *Drosophila melanogaster*: alteration in hsp70, hsp60, hsp83, hsp26, ROS generation and oxidative stress markers. *Chemosphere* 79:577–87.

Singh NP (2000) A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 256:328–337.

SM, Standard methods for the examination of water and wastewater (2005) Polynuclear aromatic hydrocarbons (6440 C). 21th edn. APHA, AWWA, WEF, Washington, pp. 6-91.

Speit G, Hartmann A (2005) The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. In: Keohavong P, Grant SG (Eds.) *Methods in Molecular Biology*, vol.291, *Molecular Toxicology Protocols*, Human Press Inc, Totowa, pp. 85-95.

Sprague JB (1971) Measurement of pollutant toxicity to fish — III. Sublethal effects and safe concentrations. *Water Res* 5:245–66.

Suzuki Y, Nagae Y, Li J, Sabaka H, Mazowa K, Takahashi A, Shimuzu H (1989) The micronucleus test and erythropoiesis: effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (*P/N* ratio). *Mutagenesis* 4:420-424.

Tarzwell CM (1962) The need and value of water quality criteria with special reference to aquatic life. *Can Fish Cult* 31:35-41.

Tas U, Ogeturk M, Meydan S, Kus I, Kuloglu T, Ilhan N, Kose E, Sarsilmaz M (2011) Hepatotoxic activity of toluene inhalation and protective role of melatonin. *Toxicol Ind Health* 27:465–73.

Teles M, Pacheco M, Santos MA (2003) *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and β -naphthoflavone. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:98–107.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–21.

Udroiu I (2006) The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicol* 79:201–204.

Ueda T, Hayashi M, Koide N, Sofuni T, Kobayashi J (1992) A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Sci Technol* 25:235–240.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (1982) Office of the Federal Registration (OFR), Appendix A: Priority pollutants. *Fed Reg* 47:52309.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (2011) Fish Short-Term Reproduction Assay OCSP Guideline 890.1350, Standard Evaluation Procedure, Endocrine Disruptor Screening Program. EPA, Washington, 19p.

Valdez Domingos FX, Oliveira Ribeiro CA., Pelletier É, Rouleau C (2011) Tissue distribution and depuration kinetics of waterborne ^{14}C -labeled light PAHs in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ Sci Technol* 45:2684–2690.

Vanzella TP, Martinez CBR, Cólus IMS (2007) Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a Neotropical fish species. *Mutat Res* 631:36–43.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39–51.

Winter MJ, Day N, Hayes RA, Taylor EW, Butler PJ, Chipman JK (2004) DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK, *Mutat Res* 552:163–175, 2004.

Winters K, Parker PL (1977) Water soluble components of crude oils, fuel oils, and used crank-case oils. *Oil Spill Conf.* pp 579–581.

CAPÍTULO 5

Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo

Resumo

Derramamentos acidentais, rompimentos de dutos de petróleo e descarga de efluentes de refinarias são eventos frequentes de contaminação de ambientes de água doce, porém os estudos sobre os efeitos tóxicos da fração solúvel do petróleo (FSP) nestes ambientes são escassos. Neste estudo, foram avaliados os efeitos deletérios da FSP em diferentes organismos e biomarcadores. Foi determinada a concentração de efeito tóxico (CE_{50}) na bactéria *Vibrio fischeri*, realizado ensaio de letalidade aguda nas espécies de peixes de água doce *Astyanax serratus* e *Danio rerio* e mensurados efeitos genéticos, celulares, hematopoiéticos e somáticos através de ensaio subletal em *A. serratus* durante período agudo (96 horas) e subcrônico (15 dias). Após exposição, foi realizado ensaio de depuração de 15, 30 e 60 dias. A concentração de hidrocarbonetos da FSP foi determinada e relacionada aos resultados dos bioensaios. Em *V. fischeri*, a $CE_{50-5min}$ foi de 11,06 % (v/v FSP) e a $CE_{50-15min}$ foi de 12,29 % (v/v FSP), correspondente à 0,14 e 0,16 mg.L⁻¹ de hidrocarbonetos aromáticos respectivamente. A FSP não foi letal para os peixes. Através do ensaio subletal foi observado aumento de quebras no DNA das células do sangue, brânquias, rim anterior, cérebro e células reprodutivas, indução de eritrócitos micronucleados, redução da frequência de eritrócitos imaturos no sangue periférico, redução do fator de condição de Fulton e aumento do índice hepatogonadosomático. Em geral, os efeitos mais severos foram observados em 96 horas de exposição, e os períodos de depuração não foram suficientes para reverter a maioria dos danos, além disso, alguns efeitos foram evidenciados durante esses períodos.

Palavras-chave: *Vibrio fischeri*; *Astyanax serratus*; *Danio rerio*; biomarcadores.

Introdução

A produção mundial média de petróleo na última década foi de 83,28 milhões de barris/dia, com taxas anuais crescentes (ANP, 2014; PB, 2014). Essa intensa exploração vem acarretando grandes impactos ambientais principalmente nos ambientes aquáticos, sendo estimado o lançamento anual de 8,3 milhões de toneladas de petróleo e derivados no mar, associados à extração, transporte e consumo (U.S. National Academy of Sciences, 2003). Embora menos divulgados, os derramamentos de petróleo em corpos de água doce são muito frequentes, com impactos até mais nocivos em comparação aos efeitos no ambiente marinho (USEPA, 2014).

Vários métodos para remediação desses impactos são aplicados em corpos de água doce, desde de técnicas físico-químicas e biológicas de contenção e biorremediação do petróleo até a restauração pelo processo de depuração natural, sendo baseados em métodos aplicados nos ambientes marinhos (Vandermeulen e Ross, 1995).

Apesar das tentativas de retirar a camada de óleo superficial, uma pequena fração é dissolvida na água. Este processo é processo importante, pois a fração solúvel do petróleo (FSP), mesmo em baixas concentrações, pode ser tóxica aos organismos aquáticos (U.S. National Academy of Sciences, 2003).

Testes ecotoxicológicos são utilizados para quantificar os danos em diferentes níveis de organização biológica e para prever a magnitude de estresse em populações naturais, comunidades ou ecossistemas, sendo importantes para a prevenção de impactos nos ecossistemas e restauração de seus serviços e funções (Moriarty, 1999).

Esses testes são frequentemente realizados com organismos representativos como microrganismos, plantas, invertebrados e peixes (Jurado *et al.*, 2012). O teste de toxicidade com a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri* tem recebido grande atenção por ser um método rápido, simples e realístico de determinação da toxicidade de diversos compostos e matrizes como água doce, salgada e extratos sólidos (Jurado *et al.*, 2012).

Em relação a outros grupos de organismos bioindicadores, os peixes apresentam várias vantagens: representam o maior e mais diverso grupo entre os vertebrados (Powers, 1989); apresentam respostas de alta relevância ecológica à

exposição a agentes tóxicos (Van der Oost *et al.*, 2003); de forma semelhante a outros grupos vertebrados (Al-Sabti e Metcalfe, 1995); formam diversos elos na teia trófica; acumulam substâncias tóxicas e respondem a baixas concentrações de xenobióticos (Çavas e Ergene-Gözükara, 2005).

Os bioensaios com peixes incluem os testes de letalidade aguda para determinar ou estimar a dose ou concentração de um xenobiótico capaz de induzir letalidade (Knie e Lopes, 2004), sendo aplicados para monitorar efluentes, para o desenvolvimento de padrões de qualidade, regulamentação de químicos e para a fiscalização ambiental (US EPA, 2002).

Além dos testes de letalidade aguda, são utilizados ensaios subletais para detectar os efeitos de contaminantes através de biomarcadores que representam alterações biológicas induzidas por xenobióticos, sendo importantes para estabelecer conexões de causa e efeito e gerar informações sobre a saúde do ecossistema (Bucheli e Font, 1995).

Biomarcadores genéticos têm recebido particular atenção nos últimos anos, principalmente o teste do micronúcleo pisco por ser aplicado com sucesso em diferentes espécies de peixes, ser simples e efetivo na detecção de agentes genotóxicos (Pacheco *et al.*, 2005). Outra técnica bem estabelecida é o ensaio cometa, utilizado como uma ferramenta de avaliação de dano e reparo no DNA, tanto quantitativamente, quanto qualitativamente em populações de células individualizadas (Olive e Banath, 2006).

Biomarcadores de citotoxicidade, como o ensaio de difusão do DNA possibilitam a identificação do mecanismo de ação do xenobiótico através da análise de indução de necrose e apoptose (Singh, 2000). Outro indicador de citotoxicidade induzida é a análise da frequência de eritrócitos imaturos, que permite o monitoramento do sistema eritropoiético, que pode ser inibido por alguns contaminantes (Suzuki *et al.*, 1989).

Análises de subunidades do organismo revelam efeitos precoces de exposição, já a avaliação de alterações que consideram o indivíduo, como os índices somáticos, evidenciam efeitos pronunciados causados pelo contaminante e são aplicados com sucesso no monitoramento de efeitos crônicos de desenvolvimento dos indivíduos de regiões antropizadas (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2013).

Considerando que a avaliação e remediação do impacto ambiental causado pelo derramamento de petróleo e derivados nos ambientes de água doce tem sido

baseada em estudos de ecossistemas marinhos (Vandermeulen e Ross, 1995; Bhattacharyya *et al.*, 2003), este estudo objetivou avaliar os efeitos ecotoxicológicos da FSP em ambientes de água doce utilizando a bactéria *Vibrio fischeri* e as espécies de peixes *Astyanax serratus* e *Danio rerio* como bioindicadoras.

Foram conduzidos experimentos de letalidade aguda com a espécie nativa neotropical *A. serratus* e para comparação de resposta foi utilizada a espécie padronizada *D. rerio* (US EPA, 2002).

Através de ensaio subletal em *A. serratus* foram analisados os efeitos deletérios da FSP em diferentes níveis de organização biológica (genético, celular e somático), que podem ter implicações severas nas populações naturais.

Para compreender se os efeitos induzidos por baixas concentrações da FSP podem ser revertidos e qual o tempo para o reestabelecimento das condições normais, foram conduzidos experimentos de exposição à FSP seguidos por períodos de depuração.

Material e Métodos

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, certificado nº688.

O petróleo bruto (American Petroleum Institute API = 26,4°) foi obtido da Petrobrás S.A., Refinaria Presidente Getúlio Vargas, RJ, Brasil. A fração solúvel do petróleo foi preparada segundo Anderson *et al.* (1974) com modificações. Foi misturada uma parte de petróleo em nove partes de água destilada (1:9) (Pacheco e Santos, 2001) por 20 horas à 1500 RPM, em agitador de inox com motor assíncrono (Arno S.A.), vedado, na ausência de luz e em temperatura ambiente. Decorrido o período de agitação, as amostras foram mantidas em repouso por 3 horas para separação das fases. A fase insolúvel foi descartada e a fração solúvel 100% (solução estoque) foi imediatamente utilizada para preparação das concentrações teste.

A toxicidade da FSP foi estimada através do ensaio de inibição da fluorescência da bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* de acordo com o protocolo do fabricante (AZUR Environmental - Microtox®, 1998). Foram testadas cinco concentrações da FSP em replicata seguindo fator de diluição 2 (Basic test), sendo 2,81; 5,63; 11,25; 22,50; 45,0 %v/v e a concentração mediana de efeito tóxico

(CE₅₀) foi determinada após as leituras de 5 e 15 minutos. A toxicidade da substância referência fenol cristal (CAS 108-95-2) foi analisada segundo o protocolo (QA test - Phenol Standard), nas concentrações de 6,2; 12,4; 24,8 e 49,5 mg.L⁻¹, com leitura após 5 minutos.

O teste foi realizado em analisador Microtox M500 e programa MicrotoxOmni. A bactéria liofilizada, assim como todos os reagentes e equipamentos foram obtidos da Microtox® AZUR Environmental.

O teste de letalidade aguda em peixes para determinação da concentração letal mediana (CL₅₀) após 96 horas de exposição foi realizado de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2011), Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 1996) e da Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 1992). O teste foi realizado com a espécie nativa neotropical *Astyanax serratus* e com a espécie padronizada *Danio rerio*, para comparação da sensibilidade dos organismos (US EPA, 2002).

Os peixes foram obtidos do comércio local e aclimatados durante trinta dias em água filtrada, com fotoperíodo natural, alimentação diária e aeração constante. Decorrido este período os peixes foram transferidos para os aquários de teste, aclimatados por cinco dias e a alimentação foi suspensa 24 horas antes do início do ensaio. Durante o experimento a alimentação foi realizada a cada 5 dias.

Foram utilizados 20 peixes por tratamento, distribuídos aleatoriamente. No ensaio com *D. rerio* foram utilizados 10 indivíduos por aquário de 10 litros, com duas replicatas. Para *A. serratus* foram mantidos 5 peixes por aquário de 10 litros com quatro replicatas. O ensaio foi realizado em sistema semi-estático com renovação de 25% da solução-teste a cada 24 horas. Nos tratamentos com a FSP a aeração foi suspensa e os aquários foram revestidos com plástico filme e tampa de vidro para evitar a volatilização dos compostos. Os testes foram acompanhados de grupos controle aerado e sem aeração. A solução de renovação foi preparada com água previamente aerada e filtrada.

Os peixes foram expostos às seguintes concentrações nominais da FSP: 48,2; 57,9; 69,4; 83,3 e 100% v/v e às concentrações de 29,6; 44,4; 66,7; 100,0 e 150,0 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio - K₂Cr₂O₇ (P.M: 294,18 CAS: 7778-50-9, Synth), que foi utilizado como substância de referência.

Os parâmetros de qualidade da água foram: temperatura 22,5 ± 0,5 °C; pH 6,0 ± 0,3 nos tratamentos com dicromato de potássio; pH 7,0 ± 0,2 nos tratamentos

com a FSP; oxigênio dissolvido $8,0 \pm 0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ nos tratamentos aerados e $6,0 \pm 1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ nos grupos sem aeração.

No ensaio subletal, foram utilizados 20 peixes da espécie *A. serratus* por tratamento, distribuídos aleatoriamente e mantidos 2 peixes por aquário (18 litros) em 10 replicatas. Foram realizados oito tratamentos, totalizando 160 peixes.

Cinco tratamentos foram realizados com a fração solúvel do petróleo, os peixes ($n = 100$) foram expostos à FSP 1,5% (v/v), sem aeração, em sistema semi-estático com renovação de 25% da solução-teste a cada 24 horas. No tratamento agudo os peixes foram expostos por 96 horas (FSP 96h) e no tratamento subcrônico por 15 dias na FSP (FSP 15d).

Decorrido o período de exposição foram sacrificados 20 peixes em cada tratamento e os demais foram transferidos para aquários com água limpa filtrada, na ausência do contaminante, para a realização dos tratamentos de depuração.

Os tratamentos de depuração foram realizados com aeração, em sistema semi-estático com renovação de 25% da água a cada 24 horas. Os peixes ($n=20/\text{tratamento}$) foram amostrados em 15 dias (DEP 15), 30 dias (DEP 30) e 60 dias (DEP 60) de depuração.

O ensaio foi acompanhado por três tratamentos de controle, sendo um controle negativo hídrico (CN), um controle positivo (CP) com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida CAS 50-18-0 na dose de 16 mg.Kg^{-1} (Matsumoto e Cólus, 2000) diluída em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 (Manjanatha *et al.*, 2014), aplicada 96 horas antes da amostragem (Grisolia, 2002) e um controle negativo (CN inj) com injeção intraperitoneal de PBS.

A água utilizada nos ensaios passou por 4 filtros (filtro de quartzo, filtros de 5 e 1 micrometros e carvão ativado) e posteriormente foi dechlorada por aeração.

Os peixes foram anestesiados com benzocaína $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ (Gontijo *et al.*, 2003), pesados, medidos (comprimento total e parcial) e sacrificados por secção medular.

O sangue foi coletado por punção cardíaca com tubo capilar heparinizado e os ovários, líquido espermático, fígado, rim anterior, cérebro e brânquia foram coletados. Os ovários e o fígado foram pesados. Todos os tecidos foram acondicionados em microtubos com soro bovino fetal (SBF) e mantidos no gelo e no escuro até o momento da homogeneização.

O ensaio cometa foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (2005) com modificações em relação a preparação das células. O sangue total (10 μ L) foi diluído em 1000 μ L soro bovino fetal (SBF) e 10 μ L dessa suspensão celular foi misturada em 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) (Cestari *et al.*, 2004; Ferraro *et al.*, 2004). Aproximadamente 1/2 do cérebro, 1/5 do fígado, o 3° arco branquial, 1/2 ovário, o esperma de um testículo e todo o rim anterior foram acondicionados em 500 μ L de SBF. O esperma foi novamente diluído na proporção de 1 parte suspensão celular em 2 partes de SBF e misturada a alíquota de 10 μ L dessa diluição em 120 μ L de LMP para a preparação das lâminas. Os demais tecidos foram desagregados (Potter-1.500 rpm) e utilizado 20 μ L de suspensão celular/120 μ L de LMP. As lâminas foram mantidas em solução de lise à 5°C, por 24 horas, posteriormente foram submetidas à corrida eletroforética em tampão alcalino, fixadas e coradas no momento da análise com brometo de etídio.

A análise das lâminas foi automatizada utilizando microscópio de fluorescência Zeiss, com camera CCD monocromática, objetiva de 20X, programa Metafer 4 - CometScan - Metasystems. Foi realizada a varredura da região de 20% ao redor do centro da lâmina e analisados 100 nucleóides por lâmina para avaliação do percentual de DNA na cauda do cometa. Não foram considerados os nucleóides com a região da cabeça pequena ou inexistente e caudas largas e difusas pois estão associados com morte celular (Olive *et al.*, 1993; Fairbairn *et al.*, 1996; Frenzilli *et al.*, 2009).

O teste do micronúcleo píceo (MNT), com coloração fluorescente de laranja de acridina foi realizado com esfregaço do sangue periférico de acordo com Ueda *et al.* (1992). As anomalias nucleares (AN) foram analisadas em eritrócitos imaturos (policromáticos) e maduros (normocromáticos), sendo: micronúcleo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN) do tipo blebbed (BL), lobed (LB), vacuolated (VC), notched (NT) (Carrasco *et al.* 1990) e células binucleadas (BN) (Çavaş e Ergene-Gözükara, 2005). Foram analisados 1000 eritrócitos por peixe sob magnificação de 1000x em microscópio Leica de epifluorescência.

A análise da frequência de eritrócitos imaturos foi realizada nas mesmas lâminas do MNT, sendo contabilizado em 1000 eritrócitos a frequência (%) de células imaturas (Çavaş e Ergene-Gözükara, 2005) para avaliação de alterações no processo de eritropoiese.

A análise de citotoxicidade foi realizada através do ensaio de difusão, baseada na fragmentação do DNA (Gichner *et al.*, 2005). O ensaio de difusão do DNA foi realizado com as células do sangue, das brânquias e do fígado, seguindo o mesmo procedimento do ensaio cometa, no entanto, as lâminas não foram submetidas à corrida eletroforética (Singh, 2000). Foram analisados 100 nucleóides por lâmina e avaliada a frequência de células normais, apoptóticas e necróticas (Frenzilli *et al.*, 2004).

Os índices somáticos foram calculados de acordo com Oliveira Ribeiro *et al.* (2013), sendo, índice hepatossomático (IHS) = $[(P \text{ Fígado}/P \text{ peixe})] \times 100$ e o fator de condição de Fulton (K_f) = $100 \times P \text{ peixe}/C^3$, onde P é o peso do peixe em gramas e C é o comprimento total em centímetros.

Foram quantificados os hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) da FSP por cromatografia gasosa/detector de ionização de chama - CG/FID (DIN, 1991) e os 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), considerados poluentes prioritários (US EPA, 1982), foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência/detector ultravioleta-detector de fluorescência - HPLC/UV-FL (SM, 2012).

Análise estatística

A Concentração letal mediana (CL_{50}) foi estimada através do programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber “LC50 Programs JSPear Test”.

A distribuição dos dados dos biomarcadores foi verificada através do teste Kolmogorov-Smirnov. Os resultados dos índices somáticos apresentaram distribuição normal e foram analisados por ANOVA seguido de Tukey.

Os demais resultados apresentaram distribuição não paramétrica. A análise da frequência de eritrócitos imaturos foi realizada através do teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes (CN x tratado). Os dados do ensaio cometa, ensaio de difusão do DNA e do teste do micronúcleo písceo foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis seguido por Dunn's para comparações entre múltiplos tratamentos.

Resultados e discussão

A concentração de efeito tóxico (CE_{50}) da fração solúvel do petróleo (FSP) para a bactéria *Vibrio fischeri* foi de 11,06% (v/v) (95% intervalo de confiança: 10,85 à

11,28%) para leitura de 5 minutos e de 12,29% (v/v) (95% intervalo de confiança: 12,01 à 12,57%) em 15 minutos (Figura 1). Relacionando a concentração nominal de efeito tóxico à concentração efetiva de hidrocarbonetos aromáticos da FSP 100% que foi de aproximadamente 1,28 mg.L⁻¹ (Tabela 2), estima-se que proporcionalmente a CE₅₀ 5 min correspondeu à aproximadamente 0,14 mg.L⁻¹ e a CE₅₀ 15 min foi de cerca de 0,16 mg.L⁻¹ de hidrocarbonetos aromáticos. Esses resultados estão de acordo com o descrito na literatura que corresponde a CE₅₀ = 0,15 mg.L⁻¹ de hidrocarbonetos totais da FSP (Arukwe *et al.*, 2008).

A concentração de efeito tóxico mediano do fenol foi CE₅₀ = 15,75 mg.L⁻¹ (95% intervalo de confiança: 12,50 à 19,85 mg.L⁻¹) após a leitura de 5 minutos (Figura 1). O resultado foi validado por estar compreendido pela faixa de toxicidade de 13,0 à 26,0 mg.L⁻¹, estabelecida pela AZUR Environmental (1998).

A concentração de fenol capaz de reduzir 50% da bioluminescência de *V. fischeri* (CE₅₀ = 15,75 mg.L⁻¹) foi maior que a da FSP (CE₅₀ = 0,14 - 0,16 mg.L⁻¹), indicando maior toxicidade da FSP em relação à substância referência.

A bactéria *V. fischeri* naturalmente emite luz através de uma reação metabólica catalisada pela enzima luciferase bacteriana que envolve a incorporação de uma molécula de oxigênio na flavina mononucleotideo reduzida (FMNH₂) e reação com o aldeído alifático de cadeia longa (RCOH) formando o complexo FMN.H₂O, que é quebrado e formado o ácido graxo (RCO₂H), flavina mononucleotideo oxidada (FMN), água e ocorre a emissão de luz (Farré *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2013).

luciferase



Na presença de substâncias tóxicas, a bioluminescência diminui em função da inibição dos processos metabólicos, sendo a quantidade de perda de luz proporcional à toxicidade da amostra (Knie e Lopes, 2004).

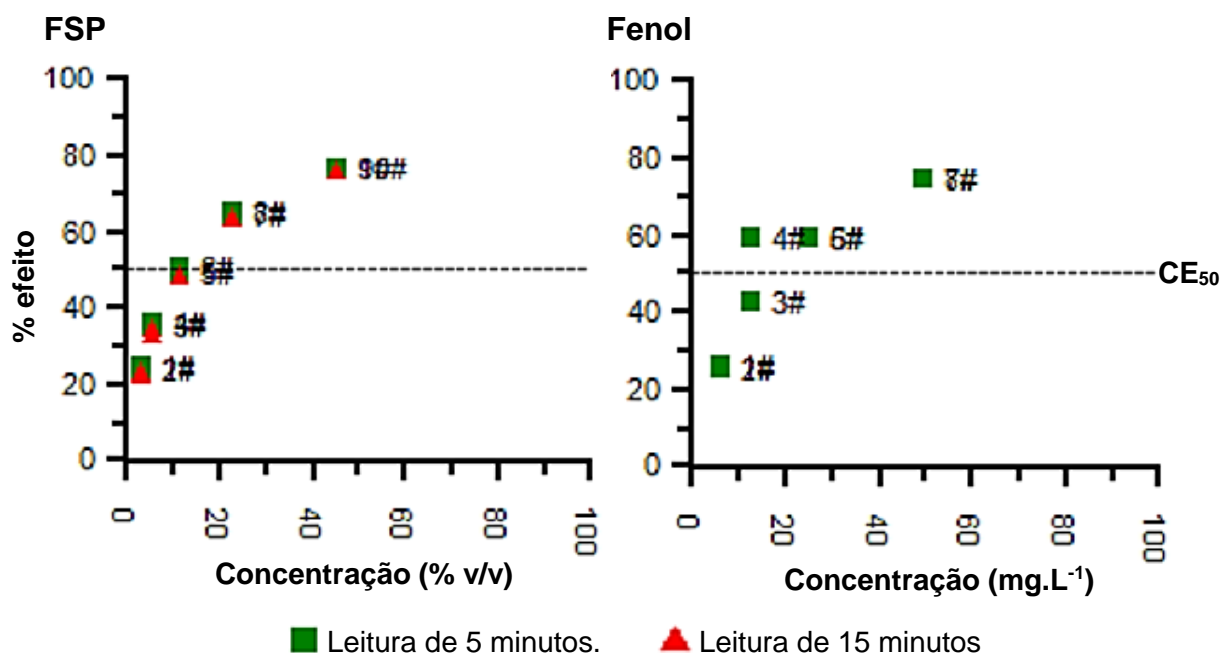


Figura 1. Efeito tóxico inibitório da bioluminescência de *Vibrio fischeri* em 5 e 15 minutos de exposição à fração solúvel do petróleo (FSP % v/v), e após 5 minutos de exposição ao fenol (mg.L⁻¹). Concentração de efeitos tóxico mediano (CE₅₀) indicada pela linha tracejada.

A FSP não foi letal para os peixes em nenhuma concentração, incluindo a FSP 100% em 96 horas de exposição. A CL₅₀ do dicromato de potássio foi de 75 mg.L⁻¹ para *A. serratus* e 84 mg.L⁻¹ para *D. rerio*.

Efeitos tóxicos letais da FSP foram descritos para larvas do peixe marinho *Odontesthes argentinensis* sendo a CL₅₀ = 70,7% v/v em relação à FSP 100% com concentração de 26632,57 µg.L⁻¹ de hidrocarbonetos aromáticos (Rodrigues *et al.*, 2010). Anderson *et al.* (1974) testaram a toxicidade de quatro tipos de petróleo em três espécies de peixes e obtiveram valores da CL₅₀ variando de 1,7 à > 19,0 ppm (x 1000 µg.L⁻¹) de hidrocarbonetos totais na fração solúvel. Os autores ressaltam que as concentrações de hidrocarbonetos solubilizados das amostras são muito altas, não sendo esperado encontrá-las no ambiente em situações de derramamentos de petróleo.

No presente estudo, a FSP não causou letalidade provavelmente devido à baixa concentração de hidrocarbonetos aromáticos da FSP 100% que foi de 1066,54 µg.L⁻¹ (Tabela 1), concentração inferior as descritas por Anderson *et al.* (1974) e Rodrigues *et al.* (2010).

A concentração de hidrocarbonetos obtida na FSP 100% após 96 horas de exposição foi similar ao descrito por Arukwe *et al.* (2008), que experimentalmente simulou a dinâmica do petróleo em ambientes abertos de água doce. Em condições naturais, são esperadas baixas concentrações de hidrocarbonetos dissolvidos após eventos de derramamentos, devido à baixa solubilidade do petróleo em água (<100 ppb) (U.S. National Academy of Sciences, 2003).

A comparação direta da toxicidade de misturas complexas, como a FSP, torna-se praticamente inviável, visto que a toxicidade pode diferir em relação ao tipo e a origem do petróleo (Neff *et al.*, 2000), depender da toxicidade relativa de cada hidrocarboneto, assim como variar devido a diferença de sensibilidade entre as espécies (Anderson *et al.*, 1974).

Na Tabela 2 está apresentada a concentração de hidrocarbonetos aromáticos da FSP utilizada no experimento subletal em peixes e de toxicidade com *V. fischeri*. A amostra da FSP 100% teve uma concentração elevada de benzo(a)antraceno, diferindo da amostra preparada para o teste de letalidade aguda.

Concentrações de HPAs similares ao obtido na FSP 100% do ensaio subletal foram detectadas em um rio receptor de efluente de refinaria de petróleo, sendo a amostra associada a indução de micronúcleos e aberrações cromossômicas em *Allium cepa* (Hoshina e Marin-Morales, 2009).

No ensaio subletal os peixes foram expostos à concentração nominal de 1,5% (v/v) correspondendo a 26,43 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de hidrocarbonetos aromáticos no período inicial e 16,99 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em 96 horas, após 15 dias a concentração obtida foi de 10,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$, em todos os períodos as amostras foram compostas principalmente por HPAs.

Concentrações similares de HPAs foram detectadas em um rio no Sul do Brasil 5 anos após um derramamento de petróleo, causando alterações bioquímicas e lesões histopatológicas em *Astyanax* sp. (Silva *et al.*, 2009).

Tabela 1. Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) da fração solúvel do petróleo (FSP) amostrados na maior e menor concentração nos aquários de teste de letalidade aguda durante o período inicial e final da exposição.

FSP (% v/v)	100%	100%	48,2%	48,2%
Período	0h	96h	0h	96h
Benzeno	316,40	245,40	300,00	277,00
Etilbenzeno	23,30	16,50	19,00	18,20
Tolueno	211,80	213,30	200,00	200,00
m,p-Xileno	53,40	31,00	33,00	32,20
o-Xileno	70,80	41,60	40,00	36,30
Total BTEX	675,70	547,80	592,00	563,70
Acenafetileno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Acenafteno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Antraceno	3,38	0,03	0,15	< 0,01
Benzo(a)antraceno	311,80	5,21	0,58	0,13
Benzo(b)fluoranteno	8,82	0,53	0,66	0,23
Benzo(g,h,i)perileno	15,83	0,83	0,90	0,37
Benzo(k)fluoranteno	3,46	0,05	0,06	0,03
Benzo(a)pireno	0,70	0,22	0,22	0,08
Criseno	5,83	0,52	0,57	0,17
Dibenzo(a,h)antraceno	10,00	4,45	3,07	3,04
Fluoreno	3,55	0,71	0,44	0,30
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Fenantreno	3,28	< 0,01	0,24	0,14
Fluoranteno	10,00	8,85	< 0,01	2,72
Naftaleno	10,00	5,00	6,00	5,03
Pireno	4,19	4,82	6,16	1,28
Total HPAs	90,84	31,22	19,05	13,52
Σ (BTEX e HPAs)	1.066,54	579,02	611,05	577,22

Tabela 2. Coeficiente de partição octanol-água (Log Kow) e concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) da fração solúvel do petróleo (FSP) utilizada no experimento subletal em peixes e de toxicidade em *V. fischeri*.

Log Kow	FSP (% v/v)	100%	1,5%	1,5%	1,5%
	Período	0h	0h	96h	15d
2,13	Benzeno	316,40	4,75	3,85	<5,00
2,69	Tolueno	211,80	3,18	2,58	<5,00
2,77	o-Xileno	70,80	1,06	0,86	<5,00
3,15	Etilbenzeno	23,30	0,35	0,28	<5,00
3,20	m,p-Xileno	53,40	0,80	0,65	<5,00
	Total BTEX	675,70	10,14	8,22	<5,00
3,37	Naftaleno	0,20	< 0,01	< 0,01	< 0,01
3,98	Acenafteno	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
4,07	Acenafetilenos	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
4,18	Fluoreno	9,25	0,27	0,06	0,06
4,45	Antraceno	1,55	0,01	< 0,01	< 0,01
4,57	Fenantreno	25,00	0,50	0,01	0,05
4,90	Fluoranteno	1,13	1,13	1,13	2,96
5,18	Pireno	14,0	4,88	0,33	0,43
5,79	Criseno	22,00	0,54	0,14	0,11
5,91	Benzo(a)antraceno	398,14	0,83	< 0,01	0,04
6,04	Benzo(b)fluoranteno	35,19	0,63	0,37	0,62
6,04	Benzo(a)pireno	15,60	0,02	0,02	0,02
6,06	Benzo(k)fluoranteno	0,08	0,08	0,08	0,08
6,50	Benzo(g,h,i)perileno	68,31	0,75	0,79	1,73
6,58	Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,10	0,10	< 0,01	< 0,01
6,84	Dibenzo(a,h)antraceno	10,00	6,55	5,84	3,91
	Total HPAs	600,55	16,29	8,77	10,01
	Σ (BTEX e HPAs)	1276,25	26,43	16,99	10,01

Os hidrocarbonetos aromáticos solubilizados na água são captados pelos peixes através das brânquias, transportados pelo sangue para todo o corpo, retornam para o coração, passam pelos órgãos constituintes do sistema urinário e hepatobiliar onde alguns compostos são biotransformados para formas mais hidrofílicas e excretados via urina (Miller, 1982; Valdez Domingos *et al.*, 2011). As formas não conjugadas (lipofílicas) são excretadas nas fezes. Metabólitos eliminados pela bile podem ser reabsorvidos pelo intestino voltando para corrente sanguínea (Jandacek e Tso, 2001).

Neste processo, os HPAs ou seus metabólitos são distribuídos pela corrente sanguínea em vários órgãos e podem ser acumulados na vesícula biliar, fígado, rim, intestino, cérebro, músculo, ossos e em lipídios (Miller, 1982; Spacie *et al.*, 1983; Valdez Domingos *et al.*, 2011). Desta forma, diversos tecidos podem ser afetados pela exposição aos hidrocarbonetos aromáticos. Neste estudo, foi observado que a exposição à FSP causou aumento de danos no DNA das células do sangue, brânquias, rim anterior, ovários, cérebro e em espermatozóides, mas não houve efeito genotóxico nas células do fígado (Figura 2).

Nas células do sangue houve aumento significativo na porcentagem de quebras no DNA em todos os tratamentos. A indução de genotoxicidade ocorreu nos períodos de exposição e de depuração, indicando que, mesmo após cessada a contaminação, não houve reparo do DNA e, com a diminuição da eritropoiese (Figura 4), não houve formação de células jovens normais que possibilitassem a recuperação das condições normais.

Em relação às células das brânquias, dos ovários e espermatozóides, os efeitos mais pronunciados de genotoxicidade ocorrem em 96 horas de exposição (FSP 96h) com redução de danos e normalização em 15 dias de exposição (FSP 15d) e nos períodos de depuração (DEP 15; DEP 30 e DEP 60).

A alta ocorrência de quebras no DNA no período agudo de exposição (FSP 96 h) pode estar relacionado à presença de hidrocarbonetos menores e mais voláteis, como os BTEX, que são associados a diversos tipos de danos aos organismos aquáticos, inclusive quebras no DNA e indução de micronúcleos em peixes (Bücker *et al.*, 2012). Entre esses compostos, o benzeno é classificado como carcinogênico para humanos e animais pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2012).

A diminuição de genotoxicidade no período de exposição subcrônico (FSP 15 d) provavelmente ocorreu devido à diminuição da concentração de HPAs e à ausência de BTEX na água neste período.

Os resultados obtidos no rim anterior e cérebro foram similares, com aumento significativo de quebras no DNA no tratamento FSP 96h, no entanto após prolongado período de depuração (DEP 60) foi observado aumento de danos no DNA.

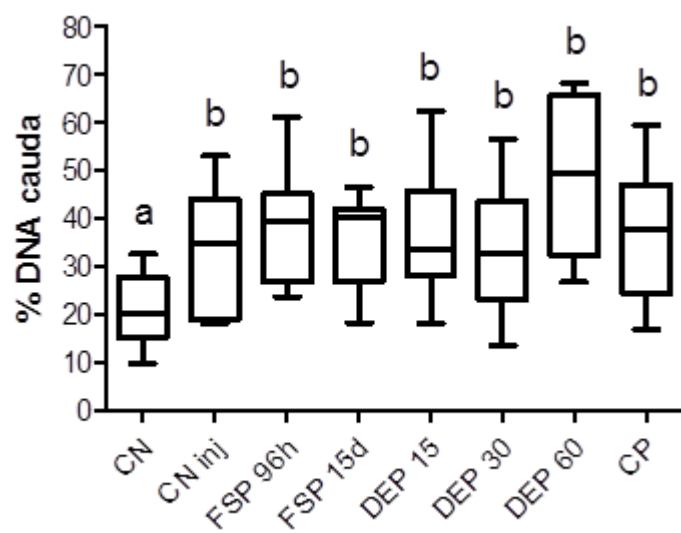
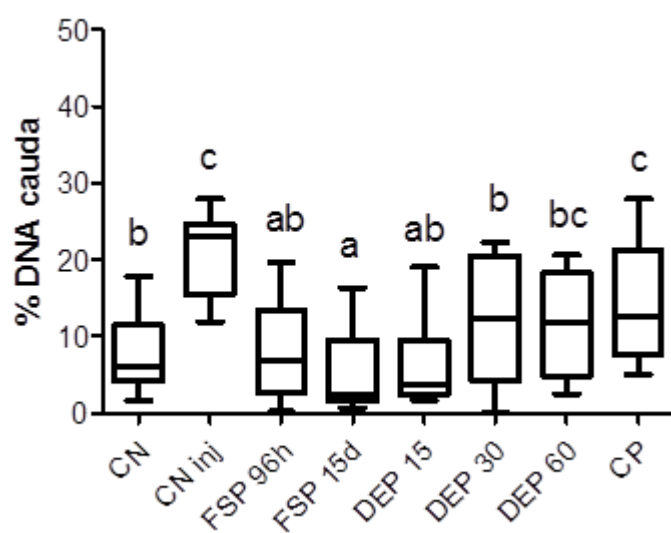
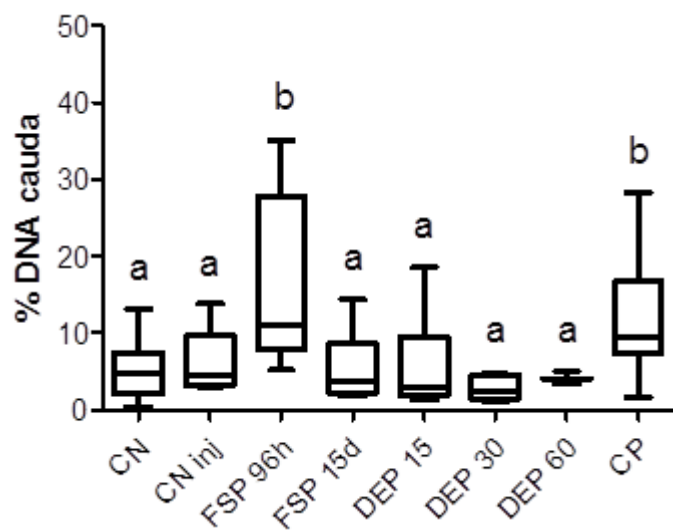
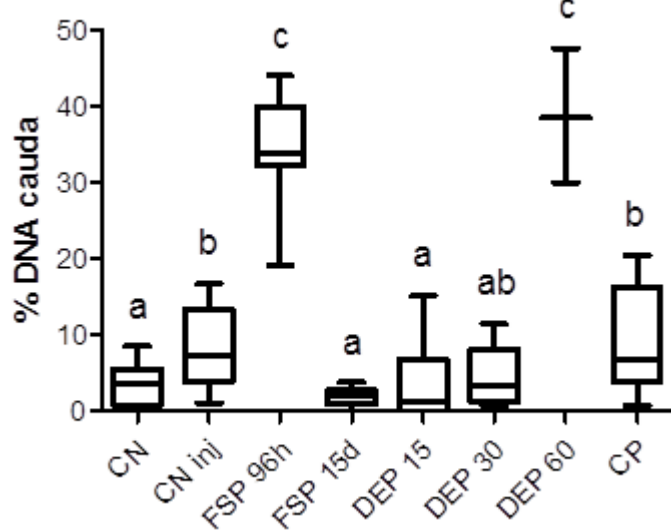
Os efeitos genotóxicos observados após depuração de 60 dias podem estar relacionados à liberação e disponibilização de HPAs previamente acumulados. Os HPAs são lipofílicos e são depositados em tecidos adiposos (Miller, 1982). Quanto maior a molécula e seu coeficiente de partição octanol-água (Log Kow) maior é a acumulação (Spacie *et al.*, 1983; Froehner *et al.*, 2011) e hidrocarbonetos aromáticos com essas características foram os mais abundantes na FSP, o que corrobora essa hipótese.

O armazenamento de substâncias nos tecidos adiposos é um mecanismo de proteção, pois reduz as concentrações de xenobióticos em outros tecidos vitais, no entanto, em condições de privação de alimento, perda de peso, por exemplo, pode haver liberação dessas substâncias (Jandacek e Tso, 2001). Relacionando os efeitos genotóxicos no período de depuração com os índices somáticos (Figura 5) pode ser observado que houve diminuição no fator de condição de Fulton, ou seja, houve perda de peso, o que pode explicar o efeito genotóxico observado no período de depuração.

Compostos lipofílicos, como o benzo(a)pireno, têm sido detectados em tecidos de diversos organismos, podem ser biomagnificados e contribuir para o risco de doenças ou alterar o desenvolvimento (Jandacek e Tso, 2001).

O benzo(a)pireno é considerado carcinogênico para humanos e animais, o mecanismo de genotoxicidade ocorre através de seus metabólitos, que induzem mutações, fazem ligações covalentes com o DNA, induzem troca de cromátides irmãs, aberrações cromossômicas, entre outros efeitos (IARC, 1983).

O HPA dibenzo(a,h)antraceno, que foi o mais abundante na FSP 1,5%, (v/v) e o benzo(a)antraceno, que é o principal HPA encontrado no ambiente, são carcinogênicos para animais. Sabe-se que o dibenzo(a,h)antraceno é embriotóxico, causa redução no crescimento, é mutagênico, induz síntese de DNA não programada e troca de cromátides irmãs (IARC, 1983).

Sangue**Fígado****Brânquia****Rim anterior**

Cont.

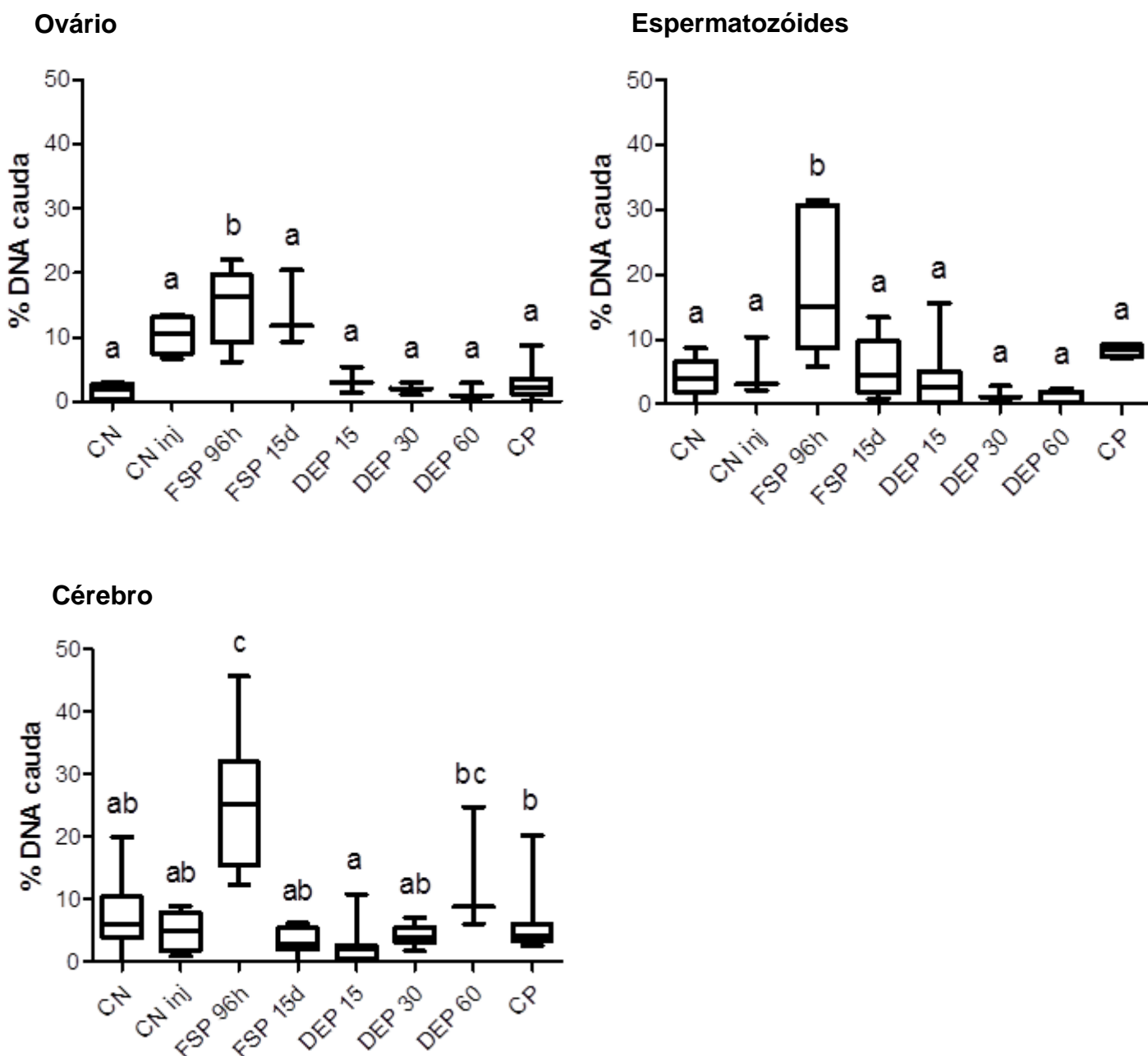


Figura 2. Danos no DNA de *Astyanax serratus* avaliados após exposição à fração solúvel do petróleo por 96 horas (FSP 96h) e 15 dias (FSP 15d) e posteriores períodos de depuração de 15 (DEP 15), 30 (DEP 30) e 60 dias (DEP 60). Controle negativo hídrico (CN), controle positivo com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (CP) e controle negativo com injeção intraperitoneal de PBS (CN inj). Percentual de DNA da cauda obtido através do ensaio cometa em diferentes tecidos: sangue; fígado; brânquia; rim anterior; ovário; espermatozóides e cérebro.

A frequência de MN em eritrócitos teve aumento significativo em 96 horas de exposição, evidenciando a ação aneugênica e/ou clastogênica da FSP, sendo reduzida e normalizada nos demais tratamentos, já a frequência de AMN não foi alterada (Figura 3).

A formação de micronúcleos em peixes expostos à FSP é descrita como consequência de processos oxidativos dos compostos mono e poliaromáticos, que podem originar substâncias eletrofílicas que associam-se com sítios moleculares no DNA, causando disfunções no mecanismo de divisão celular ou agindo diretamente no DNA (Moreira *et al.*, 2014).

O aumento da frequência de MN ocorreu no período com maior concentração de hidrocarbonetos aromáticos (FSP 96 h) e a redução foi observada nos peixes expostos por 15 dias à FSP e nos períodos de depuração, mas não deve estar associada à redução dos hidrocarbonetos aromáticos.

A redução de MN só poderia estar relacionada com a diminuição dos aromáticos da amostra caso a eritropoiese não fosse alterada e, consequentemente nesta condição seriam detectados eritrócitos jovens normais. No entanto, a redução de EI jovens no sangue periférico (Figura 4) indica que não houve normalização das células e sim que a diminuição dos eritrócitos micronucleados se deve ao recolhimento dessas células pelo baço.

A redução na frequência de eritrócitos imaturos foi observada em todos os tratamentos, evidenciando o houve efeito citotóxico induzido através da redução da eritropoiese.

Prévios trabalhos descrevem esse mesmo efeito de alta incidência de MN em 96 horas seguido por redução em 14 dias (Moreira *et al.*, 2014) e 15 dias de exposição à fração solúvel do petróleo (Delunardo *et al.*, 2013) e à fração solúvel do óleo diesel (Vanzella *et al.*, 2007) e associam esse efeito às alterações na renovação celular.

O potencial de indução de MN através da exposição da fração solúvel do petróleo e de derivados como diesel e gasolina é bem documentado (Pacheco e Santos, 2001; Vanzella *et al.*, 2007; Delunardo *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2014) e a associação com a análise da frequência de EI é crucial para entender a dinâmica do contaminante.

A FSP não foi citotóxica para as células do sangue e do fígado de *A. serratus*. Nenhum tratamento aumentou significativamente a frequência de células em necrose ou apoptose. A viabilidade celular dos tratamentos com ciclofosfamida e CN com injeção intraperitoneal também foram avaliadas com o propósito de validar os resultados dos testes de genotoxicidade (Tabela 3).

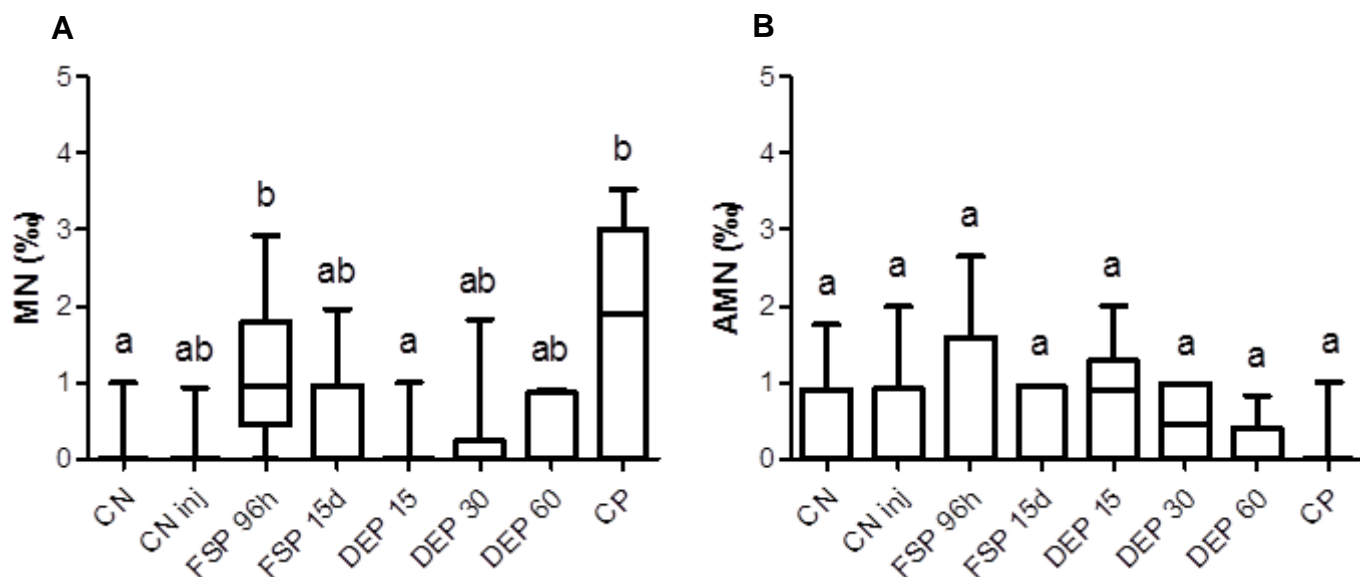


Figura 3. Teste do micronúcleo písceo em eritrócitos de *Astyanax serratus* avaliados após exposição à fração solúvel do petróleo por 96 horas (FSP 96h) e 15 dias (FSP 15d) e posteriores períodos de depuração de 15 (DEP 15), 30 (DEP 30) e 60 dias (DEP 60). Controle negativo hídrico (CN), controle positivo com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (CP) e controle negativo com injeção intraperitoneal de PBS (CN inj). Em: a) frequência de micronúcleos; b) frequência de alterações morfológicas nucleares.

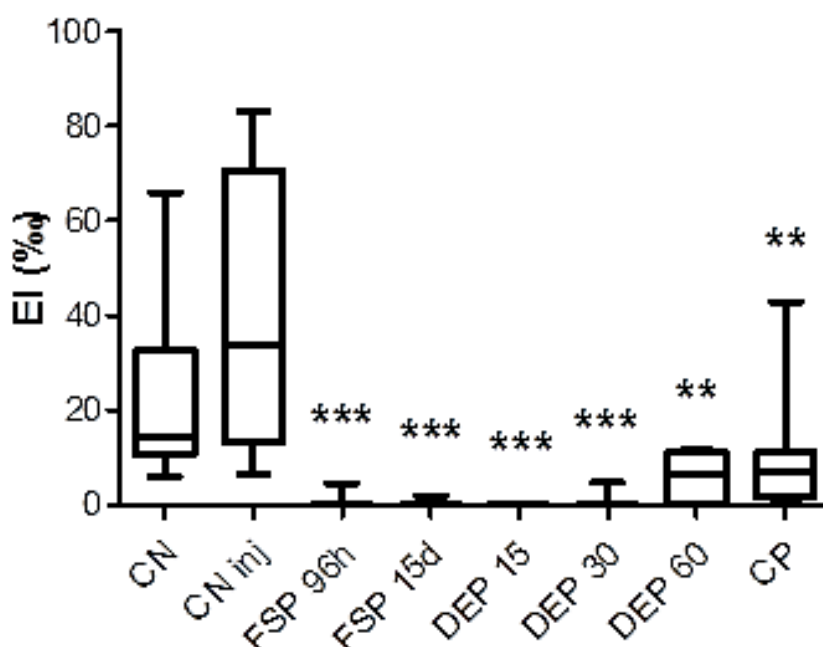


Figura 4. Frequência de eritrócitos imaturos de *Astyanax serratus* avaliados após exposição à fração solúvel do petróleo por 96 horas (FSP 96h) e 15 dias (FSP 15d) e posteriores períodos de depuração de 15 (DEP 15), 30 (DEP 30) e 60 dias (DEP 60). Controle negativo hídrico (CN), controle positivo com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (CP) e controle negativo com injeção intraperitoneal de PBS (CN inj).

Tabela 3. Avaliação de citotoxicidade através do ensaio de difusão do DNA mensurados em diferentes tecidos após períodos de exposição e depuração à FSP.

Células (%)	Sangue				Fígado			
	Normal	apoptose	Necrose	viabilidade	normal	apoptose	necrose	viabilidade
CN	96,68 ± 1,58	2,74 ± 0,78	0,58 ± 0,28	-	96,59 ± 0,65	1,82 ± 0,52	1,59 ± 0,54	-
CN inj	99,00 ± 0,37	0,89 ± 0,38	0,11 ± 0,11	+ 2,40	97,81 ± 0,42	2,00 ± 0,40	0,19 ± 0,11	+ 1,26
FSP 96h	98,53 ± 0,53	1,35 ± 0,49	0,12 ± 0,08	+ 1,91	98,66 ± 0,30	0,78 ± 0,19	0,56 ± 0,21	+ 2,14
FSP 15d	97,06 ± 0,65	2,58 ± 0,62	0,36 ± 0,20	+ 0,39	95,27 ± 1,58	4,46 ± 1,59	0,27 ± 0,14	- 1,37
DEP 15	97,35 ± 0,76	2,29 ± 0,67	0,36 ± 0,22	+ 0,69	97,15 ± 1,08	2,21 ± 0,61	0,64 ± 0,57	+ 0,58
DEP 30	96,91 ± 1,20	3,09 ± 1,20	0,00 ± 0,00	+ 0,24	94,70 ± 1,48	2,60 ± 0,54	2,70 ± 1,27	- 1,96
DEP 60	97,00 ± 1,76	3,00 ± 2,07	0,00 ± 0,00	+ 0,33	91,50 ± 2,10	6,75 ± 2,46	1,75 ± 1,03	- 5,27
Ciclofosfamida	98,73 ± 0,51	1,16 ± 0,48	0,11 ± 0,07	+ 2,12	98,00 ± 0,65	1,81 ± 0,41	0,19 ± 0,11	+ 1,46

Frequência de células normais, em apoptose e necrose. Viabilidade celular em comparação ao controle negativo. Valores apresentados como porcentagem média e desvio padrão (M ± DP).

Os resultados das análises dos índices somáticos estão apresentados na Figura 5. O fator de condição de Fulton (K_f) foi gradualmente reduzido, diferindo do controle negativo em 15 dias de exposição e nos períodos de depuração de 15, 30 e 60 dias. O fator de condição, um indicador de bem estar animal ou do “fitness” da população (Bolger e Connolly, 1989), é um índice muito utilizado para avaliação nutricional em aquicultura (Rocha *et al.*, 2005) e em ecotoxicologia é geralmente aplicado em estudos de biomonitoramento refletindo as condições crônicas de distúrbios, inclusive efeitos de poluentes sobre o crescimento e longevidade (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2005; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2013).

Considerando a homogeneidade do lote de peixes, do comprimento dos indivíduos, assim como a aleatoriedade da amostragem, e a mesma periodicidade da alimentação em todos os tratamentos, podemos inferir que a redução do K_f foi consequência da exposição à FSP, que causou redução do peso dos peixes. Esse efeito pode promover a mobilização de aromáticos acumulados nos tecidos adiposos.

O índice hepatossomático (IHS) no CN foi de $1,08 \pm 0,41$, nos peixes contaminados os valores foram gradualmente aumentando nos períodos de exposição e depuração e atingiram o maior valor no tratamento DEP 30 ($2,10 \pm 0,82$) que diferiu estatisticamente do CN, sendo posteriormente reduzido no DEP 60.

O aumento do IHS indica aumento de massa do fígado em relação à massa corpórea. Em condições naturais esse aumento pode ocorrer quando há acúmulo de reservas energéticas no fígado, necessária para o processo de vitelogênese, reprodução ou preparação para condições de recursos limitados (Querol *et al.*, 2002).

No entanto, o aumento do IHS também ocorre como consequência de contaminação ambiental. De acordo com Pinkney *et al.* (2001), o aumento do IHS é positivamente correlacionado com a presença de HPAs e com a prevalência de tumores no fígado e pode ser utilizado como uma variável preditiva de ocorrência de câncer em peixes.

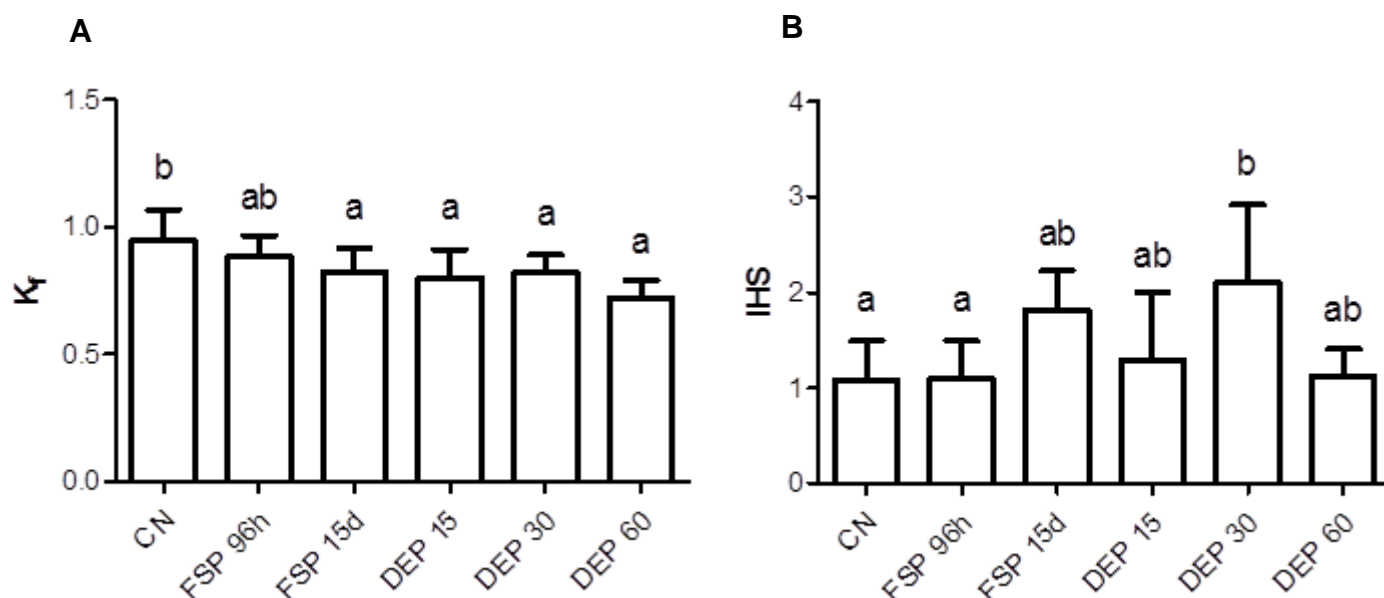


Figura 5. Índices somáticos de *Astyanax serratus* avaliados após exposição à fração solúvel do petróleo por 96 horas (FSP 96h) e 15 dias (FSP 15d) e posteriores períodos de depuração de 15 (DEP 15), 30 (DEP 30) e 60 dias (DEP 60). Controle negativo hídrico (CN), controle positivo com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (CP) e controle negativo com injeção intraperitoneal de PBS (CN inj). Em: a) fator de condição de Fulton (K_t); b) índice hepatossomático (IHS).

Considerações finais

A fração solúvel do petróleo é altamente tóxica para a bactéria *V.fischeri* e induz efeitos subletais críticos em peixes, como quebras no DNA de vários tipos celulares, aumento da frequência de micronúcleos que estão relacionados a efeitos aneugênicos, clastogênicos ou defeito no fuso mitótico e ainda alteração na eritropoiese, indicando um possível bloqueio causado pelo contaminante na taxa de renovação celular, alteração dos índices somáticos, com redução do desenvolvimento dos indivíduos e aumento do fígado, um fator de risco para a incidência de tumores. Os períodos de depuração não foram suficientes para reestabelecer as condições normais, o que compromete a saúde das populações naturais.

Nós concluímos que a FSP pode ser considerada um contaminante de amplo espectro devido aos danos causados em diferentes organismos e níveis de organização biológica.

Referências

- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas (2011) Aquatic ecotoxicology, acute toxicity, test with fish (NBR 15088), 22p.
- Al-Sabti K, Metcalfe CD (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 343:121-135.
- Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, Hightower GM (1974) Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Mar Biol* 27:75–88.
- Arukwe A, Nordtug T, Kortner TM, Mortensen AS, Brakstad OG (2008) Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environ Res* 107:362– 370.
- AZUR Environmental (1998) Microtox® Acute Toxicity Test. AZUR Environmental Carlsbad, CA.
- Bhattacharyya S, Klerks PL, Nyman JA (2003) Toxicity to freshwater organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. *Environ Pollut* 122:205–215.
- Bolger T, Connolly PL (1989) The selection of suitable indices for measurement and analysis of fish condition. *J Fish Biol* 34:171-182.
- Bucheli TD, Font K (1995) Induction of cytochrome-P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit Rev Environ Sci Technol* 25:201–268.
- Bücker A., Carvalho MS, Conceição MB, Alves-Gomes JA. (2012) Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene. *J Brazilian Soc Ecotoxicol* 7:65–73.
- Carrasco KR, Tylbury KL, Myers MS (1990) Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci* 47:2123-2136.
- Çavaş T, Ergene-Gözükara S (2005) Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ Mol Mutagen* 46:64–70.
- Cestari MM, Lemos PMM, Oliveira Ribeiro CA, Costa JRMA, Pelletier E, Ferraro MVM, Mantovani MS, Fenocchio S (2004) Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genet Mol Biol* 27:270–274.
- Delunardo FAC, Silva BF, Paulino MG, Fernandes MN, Chippari-Gomes AR (2013) Genotoxic and morphological damage in *Hippocampus reidi* exposed to crude oil. *Ecotoxicol Environ Saf* 87:1–9.

DIN, Deutsches Institut für Normung (1991) German standard methods for the examination of water, wastewater and sludge, substance group analysis (group F), determination of benzene and some of its derivatives by gas chromatography (F9), (DIN 38407 F9)

Fairbairn DW, Walburger, DK, Fairbairn JJ, O'Neill KL (1996) Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning*, 18:407-416.

Farré M, Ferrer I, Ginebreda A, Figueras, M, Olivella, L, Tirapu, L, Vilanova, M, Barceló, D (2001) Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J Chromatogr A* 938:187–197.

Ferraro M, Fenocchio A, Mario Sérgio Mantovani C de OR and MMC (2004) Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration. *Genet Mol Biol* 27:103–107.

Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat Res* 681:80-92.

Frenzilli G, Scarcelli V, Del Barga I, Nigro M, Förlin L, Bolognesi C, Sturve J (2004) DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutat Res* 552:187–195.

Froehner S, Maceno M, Machado KS (2011) Predicting bioaccumulation of PAHs in the trophic chain in the estuary region of Paranaguá, Brazil. *Environ Monit Assess* 174:135–45.

Gichner T, Mukherjee A, Wagner ED, Plewa MJ (2005) Evaluation of the nuclear DNA Diffusion Assay to detect apoptosis and necrosis. *Mutat Res* 586:38–46.

Gontijo ÁMMC, Barreto RE, Speit G, Reyes VAV, Volpato GL, Salvadori DMF (2003) Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat Res* 534:165-172.

Grisolia CK (2002) A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat Res* 518:145–50.

Hoshina MM, Marin-Morales MA (2009) Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:2090–2095.

IARC, International Agency for Research on Cancer (1983) Polynuclear Aromatic Compounds, Part I, Chemical, Environmental and Experimental Data. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization (WHO), 32nd volume, Lyon, 457p.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2012) Benzene. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization (WHO), vol. 29, Sup 7,100F, Lyon.

Jandacek RJ, Tso P (2001) Factors affecting the storage and excretion of toxic lipophilic xenobiotics. *Lipids* 36:1289–1305.

Jurado E, Serrano MF, Olea JN, Lechuga M, Jiménez JL, Ríos F (2012) Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and microalgae: a comparative study. *Bull Environ Contam Toxicol* 88:290–295.

Knie JLW, Lopes EWB (2004) Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 289p.

Manjanatha MG, Bishop ME, Pearce MG, Kulkarni R, Lyn-Cook LE, Ding W (2014) Genotoxicity of Doxorubicin in F344 rats by combining the comet assay, flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, and pathway-focused gene expression profiling. *Environ Mol Mutagen* 55:24–34.

Matsumoto FE, Cólus IMS (2000) Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genet Mol Biol* 492:489–492.

Miller GJ (1982) Ecotoxicology of petroleum hydrocarbons in the marine environment. *J Appl Toxicol* 2: 88-98.

Moreira CB, Rodrigues RV, Romano LA, Gusmão EP, Seyffert BH, Sampaio LA, Miranda-Filho KC (2014) Genotoxicity and histological alterations in grey mullet *Mugil liza* exposed to petroleum water-soluble fraction (PWSF). *Environ Sci Pollut Res* 21:5565–5574.

Moriarty F (1999) Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems. Academic Press, 3° ed., 347p.

Neff JM, Ostazeski S, Gardiner W, Stejskal I (2000) Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and diesel fuel to marine animals. *Environ Toxicol Chem* 19:1809–1821.

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development (1992) Guideline for testing of chemicals. Fish, acute toxicity test, Part 203, 9p.

Olive PL, Banáth JP (2006) The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 1:23–29.

Olive PL, Frazer G, Banath JP (1993) Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the Comet assay. *Radiat Res* 136: 130–136.

Oliveira AG, Carvalho RP, Eugene H, Cassius V (2013) Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. *Quim nova* 36:314–319.

Oliveira Ribeiro CA, Katsumiti A, França P, Maschio J, Zandoná E, Cestari MM, Vicari T, Roche H, Silva de Assis HC, Filipak Neto F (2013) Biomarkers responses in fish (*Atherinella brasiliensis*) of paranaguá bay, southern Brazil, for assessment of pollutant effects. *Braz J Oceanogr* 61:1–11.

Oliveira Ribeiro CA, Voltaire Y, Sanchez-Chardi A, Roche H (2005) Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquat. Toxicol* 74:53- 69.

Pacheco M, Santos M (2001) Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 49:64–75.

Pinkney AE, Harshbarger JC, May EB, Melancon MJ (2001) Tumor prevalence and biomarkers of exposure in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from the tidal Potomac River, USA, Watershed. *Environ Toxicol Chem* 20:1196-1205.

Powers D (1989) A fish as model systems. *Science* 246:352-358.

Querol MVM, Querol E, Gomes NNA (2002) Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio Uruguai médio, sul do Brasil. *Iheringia Série Zool* 92:79–84.

Rocha MA, Ribeiro ELA, Mizubuti IY, Silva LDF, Borosky JC, Rubin KCP (2005) Use of the alometric and the Fulton condition factors to compare the carp (*Cyprinus carpio*) considering sexes and ages. *Ciências Agrárias* 26:429-434.

Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA (2010) Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci Total Environ* 408:2054–9.

Silva CA, Oliveira Ribeiro CA, Katsumiti A, Araújo MLP, Zandoná EM, Costa Silva GP, Maschio J, Roche H, Silva de Assis HC (2009) Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:400–409.

Singh NP (2000) A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 256:328–337.

SM, Standard methods for the examination of water and wastewater (2012) 22nd ed. APHA, AWWA, WEF, Washington.

Spacie A, Landrum PF, Leversee GJ (1983) Uptake, depuration, and biotransformation of anthracene benzo[a]pyrene in Bluegill Sunfish. *Ecotoxicol Environ Saf* 341:330–341.

Speit G, Hartmann A (2005) The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. In: Keohavong P, Grant SG (Eds.) *Methods in Molecular Biology*, vol.291, Molecular Toxicology Protocols, Human Press Inc, Totowa, pp. 85-95.

Suzuki Y, Nagae Y, Li J, Sabaka H, Mazowa K, Takahashi A, Shimuzu H (1989) The micronucleus test and erythropoiesis: effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (*P/N* ratio). *Mutagenesis* 4:420-424.

U.S. National Academy of Sciences (2003) Oil in the sea III: Inputs, fates and effects. Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects; Ocean Studies Board; Marine Board; Transportation Research Board; Division on Earth and Life Studies; National Research Council. Hardcover, 280 p.

Ueda T, Hayashi M, Koide N, Sofuni T, Kobayashi J (1992) A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Sci Technol* 25:235-240.

US EPA, United States Environmental Protection Agency (1982) Office of the Federal Registration (OFR), Appendix A: Priority pollutants. Fed Reg 47:52309.

US EPA: United States Environmental Protection Agency (1996) Ecological effects test guidelines. Fish acute toxicity test, freshwater and marine, EPA, Washington, 11p.

US EPA: United States Environmental Protection Agency (2002) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5th edition, EPA, Washington, 266p.

US EPA: United States Environmental Protection Agency (2014) Emergency Management: Sensitivity of freshwater habitats. EPA's WEB archive, <http://www.epa.gov/OEM/content/learning/freshwat.htm> acesso em 24 de março de 2015.

Valdez Domingos FX, Oliveira Ribeiro CA., Pelletier É, Rouleau C (2011) Tissue distribution and depuration kinetics of waterborne ¹⁴C-labeled light PAHs in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ Sci Technol* 45:2684–2690.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57:149.

Vandermeulen JH, Ross C (1995) Oil spill response in freshwater: assessment of the impact of cleanup as a management tool. *J Environ Manage* 44:297–308.

Vanzella TP, Martinez CBR, Cólus IMS (2007) Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a Neotropical fish species. *Mutat Res* 631:36–43.

CAPÍTULO 6

Efeitos cito-genotóxicos e mutagênico da fração solúvel do petróleo e da gasolina em *Allium cepa*

Resumo

A contaminação de ambientes aquáticos por petróleo e derivados é frequente, nestes eventos parte dos compostos é solubilizada na água tornando-se biodisponível. Desta forma, este estudo objetivou avaliar os efeitos cito-genotóxicos e mutagênico da fração solúvel do petróleo (FSP) e da gasolina (FSG) utilizando o modelo *Allium cepa*. As sementes de *A. cepa* foram germinadas nas concentrações de 0,15%; 1,5% e 15% (v/v) da FSP e da FSG. A concentração de hidrocarbonetos aromáticos das amostras foi quantificada. Através da análise das células meristemáticas, foi avaliado o índice mitótico (IM), o índice de mutagenicidade (IMt), a frequência de aberrações cromossômicas (AC), micronúcleos (MN) e anomalias nucleares (AN). A FSG apresentou maior concentração de hidrocarbonetos aromáticos do que a FSP e causou aumento significativo no IM, IMt, MN e AC nas três concentrações avaliadas. A FSP causou indução de MN na menor concentração testada. Esses resultados indicam que mesmo em baixas concentrações, os hidrocarbonetos de petróleo têm potencial mutagênico. Em geral a FSG foi mais tóxica que a FSP, provavelmente pela maior concentração de aromáticos, apresentado risco aos organismos expostos, devido a capacidade de induzir efeitos genotóxicos e mutagênicos.

Palavras-chave: hidrocarbonetos aromáticos; DNA; índice mitótico; aberração cromossômica; micronúcleo.

Introdução

O petróleo é a principal matriz energética mundial, representando 32% da energia consumida (WER, 2013). No ano de 2013 foram produzidos $4.320.349 \times 10^3$ toneladas equivalentes de petróleo (tep) e as taxas de produção são crescentes, de acordo com dados da BP Revisão Estatística da Energia Mundial (2014).

O produto mais importante do refino de petróleo é a gasolina, que corresponde a 46,6% do total de derivados e estima-se que, para produção de 20 barris de gasolina, sejam necessários 100 barris de petróleo (Radovic, 1997). No Brasil, o consumo de gasolina é de aproximadamente 110.000.000 L por dia (ANP, 2013).

A intensa exploração de petróleo tem causado diversos impactos ambientais, principalmente nos ecossistemas aquáticos (Pedrozo *et al.*, 2002). Entre os diversos tipos de contaminantes relacionados às atividades antrópicas, os produtos do petróleo são uns dos que apresentam maior relevância ecotoxicológica (Pacheco e Santos, 2001).

Em eventos de derramamento de petróleo ou derivados no ambiente aquático pode ocorrer partição ou dissolução dos hidrocarbonetos. Embora a fração diluída seja relativamente pequena em comparação à massa total do óleo, ela entra intimamente em contato com os organismos, sendo um importante determinante da toxicidade (Shiu *et al.* 1990).

A fração solúvel do petróleo e derivados é constituída por uma mistura de hidrocarbonetos monoaromáticos, frequentemente denominados de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), fenóis e compostos heterocíclicos, contendo nitrogênio, enxofre (Rodrigues *et al.*, 2010) e concentrações traço de metais como ferro, níquel, cobre e vanádio (Woodle e Chandler Jr., 1952; Speight, 1997).

Entre os compostos BTEX, o benzeno é considerado carcinogênico para humanos (IARC, 2005) e o tolueno pode aumentar o processo carcinogênico de outros compostos (Dean, 1978). Outra classe de hidrocarbonetos aromáticos que apresentam risco aos organismos são os HPAs, devido ao potencial tóxico, carcinogênico e mutagênico (Aina *et al.*, 2006; Desai *et al.*, 2010) ou por serem precursores de metabólitos carcinogênicos, como o benzo(a)pireno (Newman e Unger, 2002).

Os testes mais importantes para avaliação de risco de exposição a agentes químicos são os que revelam genotoxicidade, incluindo mutagenicidade, carcinogenicidade e todos os tipos de alterações cromossômicas (Fiskesjö, 1993a).

Entre a variedade de ensaios de genotoxicidade, o teste com *Allium cepa* (Asparaginales, Alliaceae) apresenta diversas aplicações que incluem a avaliação de efeitos citotóxicos, através da análise do índice mitótico (IM) e da frequência de anomalias nucleares (AN) e detecção de efeitos mutagênicos, aneugênicos e clastogênicos através da análise de micronúcleos (MN) e aberrações cromossômicas (AC) (Leme e Marin-Morales, 2009). Apresenta alta sensibilidade de resposta a agentes genotóxicos e correlação com outros sistemas-teste, inclusive de carcinogenicidade em mamíferos (Fiskesjö, 1993b; Rank e Nielsen, 1994).

O teste com *A. cepa* é considerado um modelo eficiente para detecção de efeitos genotóxicos e mutagênicos causados por hidrocarbonetos de petróleo (Leme e Marin-Morales, 2008). Além da sensibilidade de resposta, a espécie possui um sistema de enzimas oxidase que promove a metabolização de HPAs e ativação de promutágenos em mutágenos (Fiskesjö, 1985).

Vários hidrocarbonetos aromáticos apresentarem potencial genotóxico, e são efetivamente encontrados no ambiente, principalmente aquático, no entanto, os efeitos causados pela mistura complexa desses compostos presentes na fração solúvel do petróleo e da gasolina são pouco discutidos.

Desta forma o presente estudo objetivou avaliar os efeitos cito-genotóxicos e mutagênicos da fração solúvel do petróleo e da gasolina utilizando como modelo o teste com *A. cepa*.

Material e Métodos

O petróleo bruto (CAS 8002-05-9) foi obtido da Petrobrás S.A., Refinaria Presidente Getúlio Vargas, RJ, Brasil, sendo classificado como petróleo médio ou intermediário com densidade API de 26,4°; faixa de ebulição (32 – 400 °C) e densidade de 0,89 g/cm³ à 20 °C.

As amostras de gasolina (CAS 8006-61-9) foram coletadas em frascos âmbar de 1 litro (ASTM, 2001) em postos de combustíveis aleatorizados do estado do Paraná, Brasil. As amostras foram homogeneizadas e caracterizadas quanto a densidade (0,75 g/cm³ à 20 °C) e pressão de vapor (51,5 KPa à 37,8 °C) pelo

Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUT ets) da Universidade Federal do Paraná.

As frações solúveis foram preparadas segundo Anderson *et al.* (1974), com modificações (Pacheco e Santos, 2001). Foi misturada uma parte de petróleo ou gasolina em nove partes de água destilada (1:9) e as amostras foram mantidas sob rápida agitação durante 20 horas, na ausência de luz, em temperatura ambiente em recipiente fechado.

Decorrido o período de agitação, as amostras foram mantidas em repouso para separação das fases, sendo o período de 30 minutos para a mistura de gasolina e 3 horas para a mistura com petróleo. A fase insolúvel foi descartada e a fração solúvel (100%) foi diluída para obtenção das concentrações teste.

A concentração de hidrocarbonetos aromáticos das frações solúveis do petróleo (FSP) e da gasolina (FSG) foi mensurada por cromatografia gasosa/detector de ionização de chama (DIN, 1991) para a determinação dos compostos monoaromáticos (BTEX) e por cromatografia gasosa/espectrômetro de massas (SM, 2005) para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

Foram realizados dois experimentos independentes, sendo um com a FSG e outro com a FSP, em ambos foram testadas as concentrações de 0,15%; 1,5% e 15,0% (v/v) a partir da diluição da fração solúvel 100%, controle negativo (água ultrapura) e controle positivo com metil metanosulfonato (10 mg.L^{-1}) (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3). Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura Milli-Q. Para cada tratamento foram utilizadas 100 sementes de *A. cepa* da variedade baia periforme.

O teste com as células meristemáticas de *A. cepa* foi realizado de acordo com o protocolo de Grant (1982) com modificações (Leme *et al.*, 2008). As sementes foram germinadas em estufa à 25 °C, em placas de petri, sobre papel filtro umedecido com a substância teste. Após cinco dias foi avaliada a germinabilidade através da porcentagem de sementes germinadas em cada tratamento (Iganci *et al.*, 2006), sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram radícula com no mínimo 50% do tamanho da semente (Ferreira e Áquila, 2000). As sementes germinadas foram fixadas em Carnoy para posterior preparação das lâminas.

Para a preparação das lâminas, as radículas foram coradas com reativo de Schiff e a região meristemática foi cortada sobre uma lâmina e adicionada uma gota de carmim acético 2%, o material foi esmagado sob uma lamínula e rapidamente

mergulhado em nitrogênio líquido. As lâminas foram secas ao ar, *overnight*, posteriormente foi adicionado uma gota de resina sintética no material e coberto com uma lamínula.

Foi analisado o índice mitótico (IM) correspondente a porcentagem de células em divisão, o índice de mutagenicidade (IMt) que é porcentagem de quebras cromossômicas e micronúcleos, a frequência de aberrações cromossômicas (AC), micronúcleos (MN) e anomalias nucleares (AN).

As AC foram analisadas em todas as fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase) para a identificação de núcleos lobulados, brotos, quebras, pontes, perda, aderência, atrasos cromossômicos, multipolaridade e C-metáfase. Os MN foram avaliados nas células em intérfase e em divisão e as AN foram avaliadas nas células interfásicas sendo analisados os brotos, mini células, núcleo lobulado e células polinucleadas. Foram analisadas 10 lâminas por tratamento e 500 células por lâminas, totalizando 5000 células por tratamento.

Análise estatística

Os dados apresentaram distribuição normal e a análise estatística foi realizada através do teste t não pareado, com nível de significância de 0,05.

Resultados e discussão

As concentrações de hidrocarbonetos aromáticos obtidos nas diluições da FSG variaram entre 118,60 à 11900,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo aproximadamente 100 vezes maiores do que o obtido a partir da FSP que variou de 1,00 à 120,55 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Tabela 1).

Esse resultado deve-se ao fato de que a gasolina é composta por hidrocarbonetos aromáticos menores que o petróleo, sendo assim mais solúveis em água. O petróleo bruto é uma mistura complexa de hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos que variam de estruturas de C1 a C60+ (US EPA, 2011), já a gasolina é composta predominantemente por estruturas de C5 a C11 (Farrell-Jones, 2003). Essas estruturas de hidrocarbonetos maiores, conferem ao petróleo maior ponto de ebulição (32 – 400 °C), maior densidade (0,89 g/cm^3), menor pressão de vapor e consequentemente menor mobilidade e solubilidade em água que a gasolina,

cuja a faixa de ebulição varia de 35 – 200 °C (Farrell-Jones, 2003), densidade de 0,75 g/cm³ e pressão de vapor de 51,5 KPa à 37,8 °C.

Os hidrocarbonetos aromáticos mais solúveis em água são os BTEX e o HPA naftaleno, esses compostos podem ser lixiviados até águas subterrâneas, tem elevada mobilidade ambiental e são considerados tóxicos (Farrell-Jones, 2003).

Tabela 1. Concentração de hidrocarbonetos aromáticos totais na fração solúvel do petróleo e da gasolina.

Fração solúvel	Concentração (v/v)	Hidrocarbonetos aromáticos (µg.L ⁻¹)
Petróleo	0,15%	1,00
	1,5 %	11,55
	15,0 %	120,55
Gasolina	0,15%	118,60
	1,5 %	1151,70
	15,0 %	11900,00

No experimento com a FSP a germinabilidade média foi de 66,6% ± 4,8 e no experimento com a FSG foi de 74,6% ± 9,5.

Foi observado aumento no índice mitótico (IM) das células meristemáticas que foram expostas as três concentrações da FSG (0,15%; 1,5% e 15% v/v) com aumento de células em prófase, já a FSP não teve efeito sobre este índice (Tabela 2). Em todos os tratamentos a maioria das células em divisão apresentaram os núcleos em estágio de prófase (b), diferindo significativamente das demais fases (a), mas nos tratamentos com FSG houve aumento significativo das células em prófase em comparação ao CN.

O aumento do IM é um efeito nocivo que podem levar a uma proliferação celular desordenada, com acumulação de erros genéticos e até mesmo a formação de tecidos tumorais (Preston-Martin *et al.*, 1990; Leme e Marin-Morales, 2009).

Tabela 2. Porcentagem de células em cada fase de divisão celular.

Fração Solúvel (v/v)	Tratamentos	IM	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
Petróleo	CN	62,29 ± 10,29	59,2 ± 11,3 ^b	0,8 ± 0,5 ^a	0,6 ± 0,4 ^a	0,9 ± 0,6 ^a
	0,15%	60,82 ± 11,42	59,9 ± 11,7 ^b	0,5 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,5 ^a	0,5 ± 0,2 ^a
	1,5 %	55,54 ± 14,52	56,7 ± 7,9 ^b	0,5 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^a
	15,0 %	53,52 ± 15,76	51,1 ± 15,3 ^b	0,7 ± 0,5 ^a	0,6 ± 0,4 ^a	1,1 ± 0,5 ^a
	CP	68,78 ± 8,48	66,6 ± 8,5 ^b	0,9 ± 0,6 ^a	0,5 ± 0,4 ^a	0,8 ± 0,6 ^a
Gasolina	CN	34,94 ± 9,74	31,2 ± 7,9 ^b	1,1 ± 0,7 ^a	0,5 ± 0,4 ^a	1,2 ± 0,8 ^a
	0,15%	45,50 ± 9,10 [*]	42,6 ± 8,6 ^{*b}	1,0 ± 0,4 ^a	1,0 ± 0,7 ^a	1,0 ± 0,5 ^a
	1,5 %	49,10 ± 6,99 ^{**}	46,2 ± 6,6 ^{*b}	1,0 ± 0,6 ^a	0,7 ± 0,3 ^a	1,1 ± 0,4 ^a
	15,0 %	47,54 ± 5,62 ^{**}	37,6 ± 6,4 ^{*b}	1,5 ± 0,8 ^a	0,8 ± 0,5 ^a	1,4 ± 0,7 ^a
	CP	37,82 ± 9,37	33,9 ± 9,5 ^b	1,7 ± 0,9 ^a	0,9 ± 0,4 ^a	1,5 ± 1,0 ^a

Resultados expressos como média e desvio padrão (M ± D.P.); IM: índice mitótico; Nível de significância em comparação ao controle negativo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Letras: comparação da frequência de células entre as fases de divisão celular dentro de cada tratamento, letras iguais expressam semelhança e letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A FSP causou aumento na frequência de MN apenas na menor concentração testada (FSP 0,15% v/v), indicando que não houve efeito dose-resposta. Não houve alteração na frequência de AC, AN e IMt em nenhum tratamento (Tabela 3).

Já a FSG causou indução de MN, AC e aumento do IMt nas três concentrações testadas. A exposição a FSG 0,15% v/v e 1,5% v/v aumentou a frequência de AC do tipo quebra. Na concentração de 15,0% v/v foi observada maior proporção de perdas e atrasos cromossômicos.

A frequência de AN não foi alterada em nenhum tratamento, mesmo sendo predominante a presença de células em intérfase.

As pontes cromossômicas foram as AC mais frequentes, inclusive no controle negativo, não apresentando diferença significativa em relação aos tratamentos com os xenobióticos, indicando que esse tipo de aberração ocorreu espontaneamente em condições normais. As aberrações cromossômicas do tipo C- metáfase, aderência e multipolaridade não foram observadas.

Aberrações cromossômicas ocorrem frequentemente devido a quebras de fita dupla do DNA que não foram reparadas ou mal reparadas (Maluszynska e Juchimiuk, 2005). Indicam instabilidade genômica e estão altamente relacionadas a cacinogênese (Gent *et al.*, 2001). As alterações estruturais (clastogênicas) podem ocorrer em função de quebras no DNA, inibição da síntese do DNA ou replicação errada, já as alterações numéricas (aneugênicas) são eventos de segregação anormal (Albertini *et al.*, 2000).

Neste trabalho foi observado aumento significativo de AC do tipo quebras/fragmentos, perda e atrasos cromossômicos induzidos pela exposição à FSG.

As quebras são eventos clastogênicos, considerados como aberrações instáveis (Grant, 1978) que podem ser originados de translocações cromossômicas coesivas ou provenientes de fragmentos de pontes cromossômicas (Fiskesjo, 1993b). Já a perda cromossômica é um processo aneugênico que indica risco de aneuploidia (Fiskesjo, 1985). E os atrasos cromossômicos, que foram o outro tipo de AC induzida pela FSG, são consequência de eventos de veneno de fuso (Rank, 2003), que impedem os cromossomos em mover-se para os pólos ou podem ser fragmentos de cromossomos acêntricos (Türkoğlu, 2007).

Esses três tipos de AC estão relacionados a indução de MN, que podem ser formados a partir de cromossomos inteiros ou fragmentos (Fenech, 2002) ou surgir

por não-disjunção como um resultado de exposição a veneno de fuso (Heddle *et al.*, 1991).

Conforme proposto por Fiskesjö (1985), as aberrações cromossômicas foram analisadas em todas as fases do ciclo celular. Essa metodologia permite uma avaliação mais precisa sobre o mecanismo de ação do agente testado em relação a seus efeitos no DNA assim como seu possível desenvolvimento (Leme e Marin-Morales, 2009). A partir desta análise, foi obtida a seguinte porcentagem de AC em cada fase de divisão celular: prófase ($0,0\% \pm 0,0$); metáfase ($42,9\% \pm 2,8$); anáfase ($49,6\% \pm 1,6$) e telófase ($7,5\% \pm 1,2$).

A maioria das AC foram detectadas em metáfase e anáfase e não persistiram no estágio de telófase. Esse resultado pode estar relacionado à atuação do ponto de checagem da mitose (metáfase-anáfase) que bloqueia a divisão ao detectar algum erro, ou seja, caso todos os cromossomos não estejam ligados ao fuso mitótico (Zhou *et al.*, 2002). Devido a frequência de células em telófase ser igual à frequência de células em metáfase e anáfase (Tabela 2), sugere-se que a divisão celular continuou após o reparo das AC do tipo cromossomos tardios (atrasos) e de perda cromossômica, já as quebras cromossômicas que não são passíveis para este tipo de reparo (ligação ao fuso mitótico) possivelmente foram responsáveis pela formação de MN. Essa hipótese pode ser corroborada pelos resultados positivos do IMt, que é uma relação de quebras cromossômicas e MN. Além disso, se não houvesse reparo, provavelmente haveria diminuição do IM e morte celular (Gent *et al.*, 2001) e não foram observados esses efeitos.

A maior parte dos micronúcleos obtidos em todos os tratamentos foram observados em intérfase ($34,09 \pm 10,15\%$) e em prófase ($59,09 \pm 9,11\%$), provavelmente devido à alta frequência de células nestes estágios (Tabela 2), os demais MN estavam distribuídos de forma similar entre as demais fases de divisão.

Tabela 3. Frequência de aberrações cromossômicas, micronúcleos, anomalias nucleares e índice de mutagenicidade em células meristemáticas de *A. cepa* após exposição à fração solúvel do petróleo e da gasolina.

Fração Solúvel		Tipos de AC (%)				Total AC (%)	MN (%)	AN (%)	IMt (%)
(v/v)		Ponte	Quebra	Perda	Atrasos				
Petróleo	CN	0,25 ± 0,13	0,29 ± 0,18	0,00 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,54 ± 0,39	0,60 ± 0,45	0,00 ± 0,00	0,89 ± 0,43
	0,15 %	0,22 ± 0,10	0,28 ± 0,23	0,00 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,49 ± 0,41	1,40 ± 1,01 *	0,00 ± 0,00	1,68 ± 1,16
	1,50 %	0,36 ± 0,13	0,36 ± 0,23	0,02 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,74 ± 0,43	0,68 ± 0,37	0,00 ± 0,00	0,98 ± 0,44
	15,0 %	0,43 ± 0,20	0,07 ± 0,08	0,18 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,68 ± 0,45	1,00 ± 0,51	0,00 ± 0,00	1,07 ± 0,51
	CP	0,30 ± 0,02	0,42 ± 0,10	0,18 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,90 ± 0,48	1,77 ± 1,59 *	0,00 ± 0,00	2,19 ± 1,71 *
Gasolina	CN	0,11 ± 0,13	0,02 ± 0,06	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,10	0,85 ± 0,53	0,04 ± 0,02	0,85 ± 0,53
	0,15 %	0,37 ± 0,36	0,39 ± 0,38 *	0,04 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,80 ± 0,52 **	2,02 ± 1,26 *	0,02 ± 0,01	2,41 ± 1,56 *
	1,50 %	0,36 ± 0,32	0,50 ± 0,44 ***	0,02 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,96 ± 0,65 **	2,00 ± 0,62 *	0,00 ± 0,00	2,50 ± 0,81 **
	15,0 %	0,11 ± 0,31	0,02 ± 0,06	0,23 ± 0,22 *	0,17 ± 0,18 ***	0,53 ± 0,34 **	2,60 ± 1,19 ***	0,04 ± 0,01	2,62 ± 1,19 ***
	CP	0,24 ± 0,09	0,05 ± 0,08	0,05 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,14 *	4,66 ± 2,48 ***	0,06 ± 0,02	4,70 ± 2,49 ***

Resultados expressos como média e desvio padrão (M ± D.P.); AC: aberrações cromossômicas, AN: anomalias nucleares, MN: micronúcleos; IMt: índice de mutagenicidade. Nível de significância em comparação ao controle negativo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Em resumo, a FSG causou aumento no IM, na frequência de MN, AC principalmente de quebra, perda, atrasos cromossômicos e aumento no IMt, indicando um aumento da proliferação celular, potencial aneugênico, clastogênico e mutagênico. Já a FSP apresentou resultado positivo para MN em uma única concentração.

Comparativamente, a FSG foi mais tóxica que a FSP, esse resultado pode ser atribuído a maior concentração de hidrocarbonetos aromáticos nas amostras da fração solúvel da gasolina (FSG). No entanto, a concentração de hidrocarbonetos aromáticos da FSP 15,0% foi similar a FSG 0,15% e os resultados com os biomarcadores diferiram, indicando que além da concentração, outro fator importante para a toxicidade é a composição dos hidrocarbonetos presentes, visto que existe uma ampla variedade de hidrocarbonetos aromáticos e que estes diferem em seu mecanismo de ação, inclusive de genotoxicidade (IARC, 1983).

Considerações finais

Considerando que o DNA é uma molécula comum a todos os organismos, esses danos observados no material genético de *A. cepa* alertam para o risco de exposição a hidrocarbonetos aromáticos, principalmente para os organismos aquáticos que estão mais sujeitos a este tipo de contaminação ambiental.

Referências

Aina R, Palin L, Citterio S (2006) Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L.. Chemosphere 65:666–673.

Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemmink K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Water MD, Aitio A (2000) IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. Mutat Res 463:111–172.

Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, Hightower GM (1974) Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. Mar Biol 27:75–88.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (2013) Evolução do mercado de combustíveis e derivados: 2000-2012. Estudo Temático 01/2013/SPD. Superintendência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico, 26p.

ASTM, American Society for Testing and Materials (2001) Standard practice for manual sampling of petroleum and petroleum products, (D 4057). In: Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, pp. 715-732.

BP (2014) Statistical Review of World Energy, 63rd edition, London, 48 p.

Dean BJ (1978) Genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutat Res* 47:75–97.

Desai SR, Verlecar XN, Ansari ZA, Jagtap TG, Sarkar A, Vashistha D, Dalal SG (2010) Evaluation of genotoxic responses of *Chaetoceros tenuissimus* and *Skeletonema costatum* to water accommodated fraction of petroleum hydrocarbons as biomarker of exposure. *Water Res* 44:2235-2244.

DIN, Deutsches Institut für Normung (1991) German standard methods for the examination of water, wastewater and sludge, substance group analysis (group F), determination of benzene and some of its derivatives by gas chromatography (F9), (DIN 38407 F9), Berlin.

Farrell-Jones J (2003) Petroleum hydrocarbons and polyaromatic hydrocarbons. In: Clive Thompson K, Nathanail CP (eds) Chemical analysis of contaminated land, 1 st edition, CRC Press, Boca Raton, pp. 132-188.

Fenech M (2002) Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology* 181:411-416.

Ferreira AG and Aquila MEA (2000) Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. *Rev Bras Fisiol Veg* 12:175-204.

Fiskesjö G (1985) The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102:99-112.

Fiskesjö G (1993a) The Allium Test – A potential standard of assessment of environmental toxicity. In: Gorsuch JW, Dwyer FJ, Ingersoll CG, La Point WT (eds) Environmental Toxicology and Risk Assessment, 2nd vol, ASTM, Philadelphia, pp. 331-345.

Fiskesjö G (1993b) The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. *Environ Toxicol Water Qual* 8:291–298.

Gent DC Van, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2:196–206.

Grant WF (1978) Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. *Environ Health Perspect* 27:37–43.

Grant WF (1982) Chromosome aberration assays in *Allium*. *Mutat Res* 99:273–291.

Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys Ph, Macgregor JT (1991) Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen* 18:277-291.

IARC, International Agency for Research on Cancer (1983) Polynuclear Aromatic Compounds, Part I, Chemical, Environmental and Experimental Data. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization (WHO), 32nd volume, Lyon, 457p.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2005) Benzene. In: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization (WHO), 100F volume, Lyon, 100F, pp.249-294.

Iganci JRV, Bobrowski VL, Heiden G, Stein VC, Rocha BHG (2006) Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. *Arq Inst Biol* 73:79-82.

Leme DM and Marin-Morales MA (2008) Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water-a case study. *Mutat Res* 650:80–86.

Leme DM and Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res* 682:71–81.

Leme DM, de Angelis DDF, Marin-Morales MA (2008) Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquat Toxicol* 88:214–219.

Maluszynska J and Juchimiuk J (2005) Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arh Hig Rada Toksikol* 56:177–184.

Newman MC and Unger MA (2002) Fundamentals of ecotoxicology, 2nd edition CRC Press, Boca Raton, 480p.

Pacheco M, Santos M (2001) Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 49:64–75.

Pedrozo MFM, Barbosa EM, Corseuil HX, Schneider MR, Linhares MM (2002) Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. NEAMA, Salvador, 229p.

Preston-martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE (1990) Increased cell division as a cause of human cancer¹. *Perspect Cancer Res* 50:7415–7421.

Radovic, L.R (1997) Petroleum. In: Radovic LR, Schobert HH (Eds) Energy and Fuels in Society: Analysis of Bills and Media Reports. 2nd edition, McGraw-Hill (College Custom Series) pp. 137–168.

Rank J (2003) The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologija* 1:38-42.

Rank J and Nielsen MH (1994) Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat Res* 312:17-24.

Rodrigues RV, Miranda-Filho KC, Gusmão EP, Moreira CB, Romano LA, Sampaio LA (2010) Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Sci Total Environ* 408:2054-2059.

Shiu WY, Bobra M, Aila MB (1990) The water solubility of crude oils and petroleum products. *Oil Chem Pollut* 7:57–84.

SM, Standard methods for the examination of water and wastewater (2005) Polynuclear aromatic hydrocarbons (6440 C). 21th edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, pp 6-91.

Speight JG (1997) Petroleum chemistry and refining. 1st edition, CRC Press, Boca Raton, 350 p.

Türkoğlu S (2007) Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutat Res* 626: 4–14.

US EPA, U.S. Environmental Protection Agency (2011) Hazard Characterization Document, Screening-Level Hazard Characterization, Crude Oil Category Sponsored Chemical, Crude Oil (CASRN 8002-05-9), 45p.

Zhou J, Yao J, Joshi HC (2002) Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. *J Cell Sci* 115:3547–3555.

WER: World Energy Resources (2013) Oil World Energy Council. In: World Energy Resources. World Energy Council, London, pp. 60–115.

Woodle RA and Chandler Jr. WB (1952) Mechanism of occurrence of metals in petroleum distillates. *Ind Eng Chem Res* 44:2591-2596.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grandes quantidades de petróleo e derivados como a gasolina contaminam frequentemente os ambientes aquáticos em todo o mundo. Os efeitos desses compostos no ambiente, assim como a toxicidade, estão diretamente relacionados à composição, e à concentração de hidrocarbonetos aromáticos solubilizados na água, que tornam-se biodisponíveis e podem levar a danos tóxicos severos, desde letalidade à injúrias em compartimentos subcelulares como o DNA.

O grau de toxicidade desses compostos solubilizados, ou seja da fração solúvel do petróleo (FSP) ou gasolina (FSG) também está relacionado ao tempo de exposição e sensibilidade dos organismos. Nas tabelas 1 e 2 estão apresentados resumidamente, os efeitos tóxicos da FSG e da FSP, respectivamente, em diferentes organismos, tempos de exposição e concentrações.

A concentração letal mediana (CL₅₀) da FSG foi de 20% (v/v) para a espécie de peixe *Danio rerio* e de 15% (v/v) para *Astyanax altiparanae*. A concentração de efeito tóxico mediano (CE₅₀) para a bactéria *Vibrio fischeri* foi de 5% (v/v).

A concentração 1,5% (v/v) da FSG, não produziu efeito letal em peixes, em 96 horas de exposição, e foi utilizada nos ensaios subletais. Esta concentração, causou aumento de quebras no DNA das células do sangue e aumento da frequência de neutrófilos, também foi observada a acumulação de metabólitos de HPAs na bile dos peixes.

No tratamento de depuração gradual (DG), mesmo com a redução da concentração da FSG, foi observada a indução da frequência de micronúcleos (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN), aumento da frequência de eritrócitos imaturos (EI) e de trombócitos, assim como, houve redução do fator de condição de Fulton (Kf). Não houve reparo das quebras no DNA das células do sangue. A partir deste tratamento houve eliminação dos metabólitos da bile.

Nos tratamentos de depuração total (DEP 15 e DEP 30) houve normalização das frequências de MN, AMN e de EI. Já frequência de trombócitos se manteve elevada, e adicionalmente foi observado aumento de linfócitos em 30 dias de depuração. As quebras no DNA das células do sangue persistiram e foi observado efeito genotóxico nas células do fígado e em espermatozóides.

Em *Allium cepa*, a FSG causou aumento do índice mitótico (IM), da frequência de micronúcleos (MN), aberrações cromossômicas e do índice de mutagenicidade (IMt).

Em relação aos efeitos tóxicos da FSP, foi obtida a CE_{50} entre 11,06 e 12,29% (v/v) para *V. fischeri*. Em *A. cepa*, a FSP induziu aumento apenas da frequência de MN.

A FSP não foi letal para as espécies *Danio rerio* e *Astyanax serratus* em nenhuma concentração testada, inclusive na FSP 100%. Nos ensaios subletais, os peixes foram expostos a concentração de 1,5% FSP (v/v), de forma similar à FSG. Em 96 horas de exposição, foi observada indução de MN, aumento de quebras no DNA das células do sangue, das brânquias, do rim anterior, do cérebro, dos ovários e espermatozóides, e redução da frequência de EI.

Após 15 dias de exposição, a concentração de aromáticos na água foi reduzida, e houve normalização da frequência de MN e redução das quebras no DNA da maioria dos tecidos. No entanto alguns efeitos persistiram, como as quebras no DNA das células do sangue e à drástica redução de EI. Além disso, neste período houve redução do Kf.

Nos tratamentos de depuração total de 15, 30 e 60 dias (DEP 15, DEP 30 e DEP 60), a frequência de EI, o Kf, e os danos no DNA das células do sangue não foram normalizados. Adicionalmente, houve um aumento no índice hepatossomático (IHS) em 30 dias de depuração e aumento de genotoxicidade no rim anterior em 60 dias de depuração.

Em geral, pode ser observado que o petróleo foi menos tóxico que a gasolina, esse efeito deve-se ao fato que o petróleo é menos solúvel que seus produtos destilados.

O processo de depuração permitiu a recuperação de algumas condições, como genotoxicidade em alguns tecidos, por outro lado outros danos persistiram por longos períodos, como a citotoxicidade eritropoiética e alterações dos fatores de condição, além disso, alguns danos foram evidenciados apenas nos períodos de depuração, indicando uma resposta à condição de estresse a longo prazo.

As implicações desses efeitos tóxicos que foram observados através dos biomarcadores são difíceis de serem estimadas em populações naturais, por meio de uma simples relação de nexo causal. Esses efeitos podem alertar sobre os riscos que

os organismos estão sujeitos, principalmente pelo potencial genotóxico da FSP e da FSG e que pode levar à uma série de distúrbios.

O fato preocupante é que, devido à ampla distribuição dos hidrocarbonetos petrogênicos em diferentes ambientes, os organismos em geral estão sujeitos aos efeitos dessa exposição que implicam em prejuízo à saúde das comunidades afetadas.

Tabela 1. Sumário dos efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel da gasolina.

FSG (%v/v)	Efeito	Organismo	Tempo
28,0%	100% letalidade	<i>D. rerio</i>	24 h
20,0%	100% letalidade	<i>A. altiparanae</i>	24 h
	CL ₅₀	<i>D. rerio</i>	96 h
15,0%	CL ₅₀	<i>A. altiparanae</i>	96 h
5,0%	CE ₅₀ (dados não apresentados)	<i>V. fischeri</i>	15 min.
	Aumento %: IM, MN, AC e IMt	<i>A. cepa</i>	5 d
1,5%	Aumento %: IM, MN, AC e IMt		5 d
	CENO (letalidade)	<i>A. altiparanae</i>	96 h
	Acumulação HPAs na bile		96 h
	Aumento %: quebras no DNA		96 h
<1,5% DG	Alterações hematológicas		15 d
	Aumento %: MN		15 d
	Aumento %: AMN		15 d
	Aumento: %EI		15 d
	Danos DNA		15 d
	Redução: Kf		15 d
0,15%	Aumento %: IM, MN, AC e IMt	<i>A. cepa</i>	5 d
0% – DEP 15	Alterações hematológicas	<i>A. altiparanae</i>	15 d
	Redução: Kf		15 d
	Redução: IHS		15 d
0% – DEP 30	Alterações hematológicas		30 d
	Danos DNA		30 d

FSG fração solúvel da gasolina; DG depuração gradual; DEP depuração total; CL₅₀ concentração letal mediana; CE₅₀ concentração de efeito tóxico mediano; IM índice mitótico; MN micronúcleos; AC aberrações cromossômicas; IMt índice de mutagenicidade; CENO concentração de efeito não observado; AMN alterações morfológicas nucleares; EI eritrócitos imaturos; Kf fator de condição de Fulton; IHS índice hepatossomático.

Tabela 2. Sumário dos efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo.

FSP (%v/v)	Efeito	Organismo	Tempo
100,0%	não letal	Peixes	24 h
12,29%	CE ₅₀	<i>V. fischeri</i>	15 min
11,06%	CE ₅₀		5 min
1,5%	Aumento %: MN	<i>A.serratus</i>	96 h
	Aumento %: quebras no DNA		96 h
	Redução %: EI		96h
	Aumento %: quebras no DNA		15d
	Redução: Kf		15d
0,15%	Aumento %: MN	<i>A. cepa</i>	5d
0% – DEP 15	Quebras no DNA	<i>A.serratus</i>	15 d
	Redução %: EI		15 d
	Redução: Kf		15 d
0% – DEP 30	Aumento: IHS		30 d
0% – DEP 60	Quebras no DNA		60 d
	Redução %: EI		60 d
	Redução: Kf		60 d

FSP fração solúvel do petróleo; DEP depuração total; CE₅₀ concentração de efeito tóxico mediano; MN micronúcleos; EI eritrócitos imaturos; Kf fator de condição de Fulton; IHS índice hepatossomático.

ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 688

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

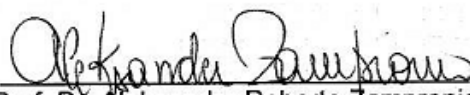
PROCESSO: 23075.000131/2013-41

APROVADO: 23/05/2013 – R.O. 04/2013

TÍTULO: Avaliação genotóxica do petróleo e combustíveis derivados em *Astyanax altiparanae* (Characidae)

AUTORES: Marta Margarete Cestari, Gabrieli Limberger Galvan, Carlos Itsuo Yamamoto, Helena Cristina Silva de Assis, Franciele Lima Bettim

DEPARTAMENTO: Genética


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA